



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201138817 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099143326

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

A61P15/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/10

歐洲專利局

09075546.3

(71)申請人：拜耳先靈製藥公司 (德國) BAYER SCHERING PHARMA AG (DE)

德國

(72)發明人：歐特 克利斯汀 OTTO, CHRISTIANE (DE)；沃夫 西格蒙 WOLF, SIEGMUND (DE)；弗雷柏格 克里斯多夫 FREIBERG, CHRISTOPH (DE)；荷倫格 愛瑟爾 HARRENGA, AXEL (DE)；葛瑞分 塞蒙尼 GREVEN, SIMONE (DE)；特勞特文 馬克 TRAUTWEIN, MARK (DE)；布勞德 桑卓雅 BRUDER, SANDRA (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：20 共 124 頁

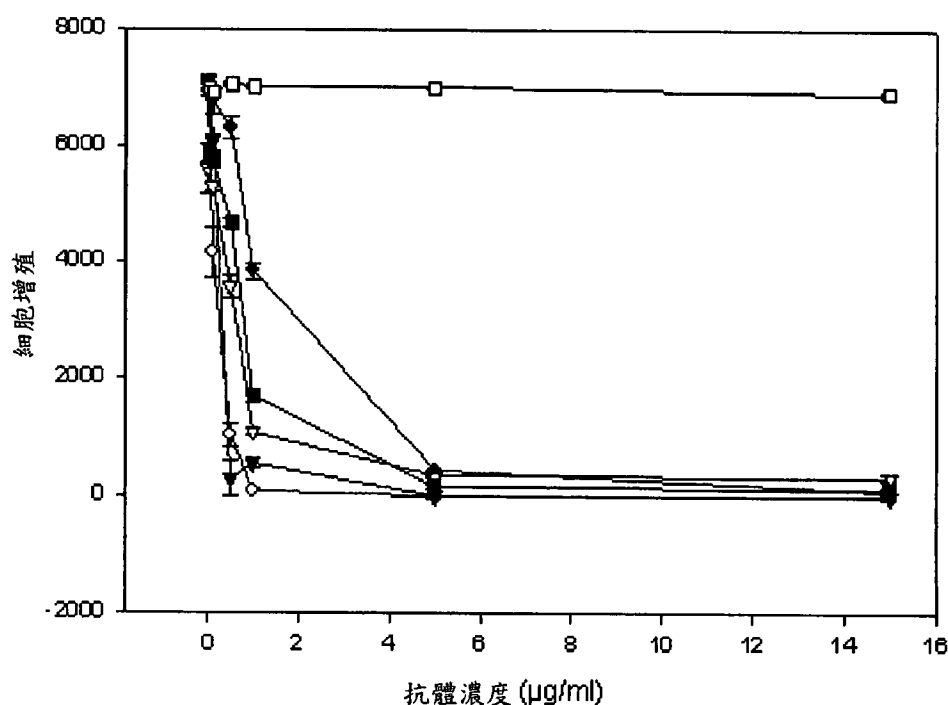
(54)名稱

催乳激素受體中和抗體及其治療用途

NEUTRALIZING PROLACTIN RECEPTOR ANTIBODIES AND THEIR THERAPEUTIC USE

(57)摘要

本發明係有關催乳激素受體中和抗體 002-H08 及抗原結合片段、含其之醫藥組合物及其在以下方面之用途：治療或預防由催乳激素受體介導之良性病症及適應症，諸如子宮內膜異位症、子宮腺肌症、雌性非激素性避孕、良性乳房疾病及乳腺痛、泌乳抑制、良性前列腺增生、類纖維瘤、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少；及在組合激素療法中用以抑制乳腺上皮細胞增殖之聯合治療。本發明抗體阻斷催乳激素受體介導之信號傳導。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201138817 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099143326

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

A61P15/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/10

歐洲專利局

09075546.3

(71)申請人：拜耳先靈製藥公司 (德國) BAYER SCHERING PHARMA AG (DE)

德國

(72)發明人：歐特 克利斯汀 OTTO, CHRISTIANE (DE)；沃夫 西格蒙 WOLF, SIEGMUND (DE)；弗雷柏格 克里斯多夫 FREIBERG, CHRISTOPH (DE)；荷倫格 愛瑟爾 HARRENGA, AXEL (DE)；葛瑞分 塞蒙尼 GREVEN, SIMONE (DE)；特勞特文 馬克 TRAUTWEIN, MARK (DE)；布勞德 桑卓雅 BRUDER, SANDRA (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：20 共 124 頁

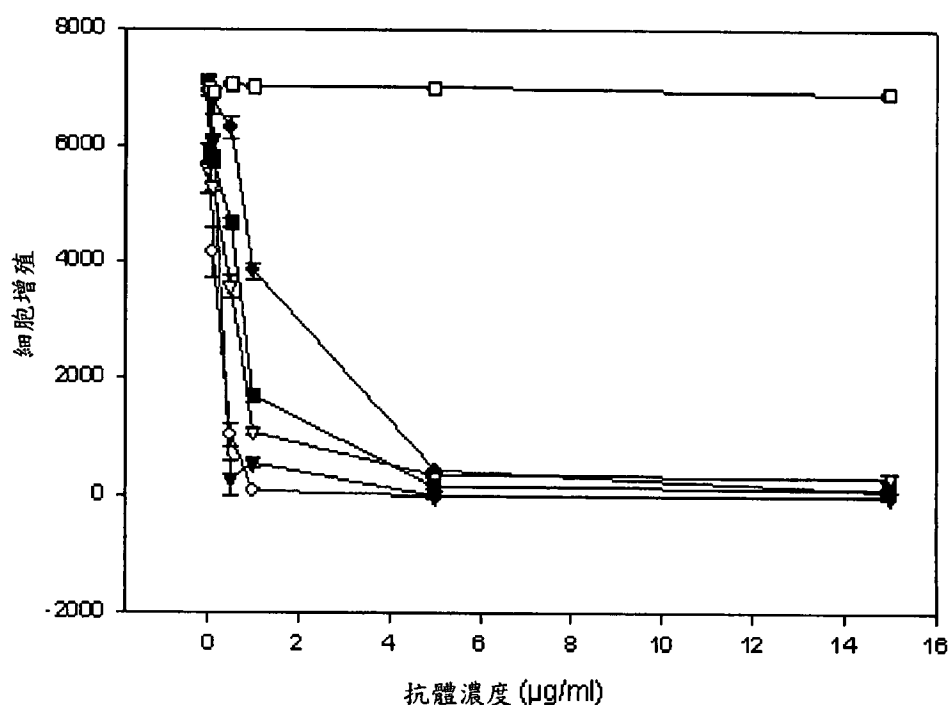
(54)名稱

催乳激素受體中和抗體及其治療用途

NEUTRALIZING PROLACTIN RECEPTOR ANTIBODIES AND THEIR THERAPEUTIC USE

(57)摘要

本發明係有關催乳激素受體中和抗體 002-H08 及抗原結合片段、含其之醫藥組合物及其在以下方面之用途：治療或預防由催乳激素受體介導之良性病症及適應症，諸如子宮內膜異位症、子宮腺肌症、雌性非激素性避孕、良性乳房疾病及乳腺痛、泌乳抑制、良性前列腺增生、類纖維瘤、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少；及在組合激素療法中用以抑制乳腺上皮細胞增殖之聯合治療。本發明抗體阻斷催乳激素受體介導之信號傳導。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關催乳激素受體抗體002-H08，且提供特異性結合並中和催乳激素受體的重組抗原結合區及含有該等抗原結合區之抗體及功能片段、編碼前述抗體之核酸序列、含有該等核酸序列之載體、含有上述者之醫藥組合物及其在以下方面之用途：治療或預防可受益於抑制催乳激素受體介導之信號傳導的良性疾病及適應症，諸如子宮內膜異位症、子宮腺肌症、雌性非激素性避孕、良性乳房疾病、乳腺痛、泌乳抑制、良性前列腺增生、類纖維瘤以及高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少；及在組合激素療法中用以抑制乳腺上皮細胞增殖之聯合治療。

【先前技術】

關於以下項，存在尚待滿足的醫學需要：對各種良性疾病及適應症之治療，諸如治療子宮內膜異位症、子宮腺肌症、雌性非激素性避孕、良性乳房疾病、乳腺痛、泌乳抑制、良性前列腺增生、類纖維瘤、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少；及在組合(亦即雌激素加助孕素)激素療法中對乳腺上皮細胞增殖之預防。

催乳激素(PRL)為由199個胺基酸構成之多肽激素。PRL屬於多肽激素之生長激素(GH)、胎盤催乳素(PL)家族，且在垂體催乳素細胞中及在若干垂體外組織中合成，該等垂體外組織諸如有淋巴細胞、乳腺上皮細胞、子宮肌層及前列腺。兩種不同啟動子調控垂體及垂體外PRL合成

(BioEssays 28:1051-1055, 2006)。

PRL結合於PRL受體(PRLR)，即一種單一跨膜受體，其屬於1類細胞激素受體超家族(Endocrine Reviews 19:225-268, 1998)。PRLR呈三種不同同功異型物形式，即可按細胞質尾長度區分之短型、長型及中型。在配位體結合之後，連續的過程引起PRLR活化。PRL經由其結合位點1與一個PRLR分子相互作用，隨後經由其結合位點2吸引第二受體分子，從而產生PRLR之活性二聚體。PRLR二聚合使得JAK/STAT(Janus激酶/信號轉導子與轉錄活化子)路徑被顯著活化。在受體二聚合之後，與受體締合之JAK(主要為JAK2)彼此間發生轉磷酸化及活化。另外，PRLR亦被磷酸化且可結合於含SH2域之蛋白質，諸如STAT。結合受體之STAT隨後被磷酸化，自受體解離且易位至其刺激標靶基因之轉錄所在之核中。另外，已描述PRLR對Ras-Raf-MAPK路徑之活化及對細胞質src激酶之活化(關於綜述，請參見Endocrine Reviews 19:225-268, 1998)。

PRLR介導之信號傳導在諸如以下之各種過程中起作用：乳腺發育、泌乳、生殖、乳房腫瘤及前列腺腫瘤生長、自體免疫疾病、全身生長及新陳代謝以及免疫調節(Endocrine Reviews 19:225-268, 1998；Annu. Rev. Physiol. 64:47-67, 2002)。

目前，不可能完全干擾PRLR介導之信號傳導。干擾PRLR介導之信號傳導的唯一途徑為利用溴麥角環肽(bromocriptine)及其他多巴胺(dopamine)受體2促效劑抑制

垂體PRL分泌(Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism 2(10): 571-581, 2006)。然而，該等試劑不抑制可成功補償垂體PRL合成之抑制的垂體外PRL合成，從而產生幾乎未受損之PRLR介導之信號傳導(Endocrine Reviews 19:225-268,1998)。因此，多巴胺2型受體促效劑不利於罹患乳癌或自體免疫疾病(諸如全身性狼瘡或類風濕性關節炎)之患者並不令人驚訝(Breast Cancer Res. Treat. 14:289-29, 1989; Lupus 7:414-419, 1998)，即使該等疾病牽涉有催乳激素亦然。乳癌細胞或淋巴細胞中之局部催乳激素合成分別在乳癌或自體免疫疾病中起關鍵作用，且其不能被多巴胺受體促效劑阻斷。

儘管已為了提供用於以下之方法而作了上述努力：治療或預防良性疾病及適應症(諸如子宮內膜異位症、子宮腺肌症、雌性非激素性避孕、良性乳房疾病及乳腺痛、泌乳抑制、良性前列腺增生、類纖維瘤、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少)及在組合激素療法中用以預防乳腺上皮細胞增殖之聯合治療，但尚無任何可滿足該需要之化合物可利用。因此，本發明之一個目標在於藉由提供作為該等良性疾病及適應症之治療劑之化合物來解決該問題。

現在，已鑑別出新穎抗體，其對PRLR具有特異性及具有高親和力，因此中和PRLR介導之信號傳導，且可向個體提供治療益處。

藉由中和PRLR抗體阻斷PRLR活化可完全抑制PRLR介導

之信號傳導。相比之下，多巴胺受體促效劑可能僅干擾回應於增加之垂體催乳激素分泌而增強的PRLR介導之信號傳導，而不干擾因活化PRLR突變或局部增加之催乳激素產生而增強的PRLR介導之信號傳導。

因此，藉由提供以高親和力結合於PRLR、可有效中和PRLR介導之信號傳導且較佳可與其他物種(諸如恆河獼猴(*Macacca mulatta*)及食蟹獼猴(*Macacca fascicularis*)、小家鼠(*Mus musculus*)或褐家鼠(*Rattus norvegicus*))之PRLR交叉反應的抗體002-H08及其抗原結合片段或其變異體用於治療先前提及之良性疾病及適應症來解決該問題。

一些PRLR抗體已描述於申請案WO 2008/022295 (Novartis)及美國專利7,422,899(Biogen)中。本發明係基於如下發現：新穎抗體對PRLR具有特異性及具有高親和力，因此中和PRLR介導之信號傳導，且可向個體提供治療益處(新穎抗體之序列如SEQ ID NO: 36、42、48及54中所示)。本發明抗體可為人類抗體或人類化抗體或嵌合抗體或經人類化工程改造，且可用於許多情況中，該等情況更全面地描述於本文中。

【發明內容】

因此，本發明之一個目標在於一種抗體或抗原結合片段，其中該抗體拮抗催乳激素受體介導之信號傳導。

新穎抗體『006-H08』、『002-H06』、『006-H07』、『001-E06』、『005-C04』為相應申請案之標的。

該等抗體於鼠類疾病模型中之活體內表徵僅對展現與鼠

類催乳激素受體之交叉反應性之抗體有可能。僅如相應申請案中所揭示之抗體005-C04顯示與鼠類催乳激素受體有充分的交叉反應性，且因此為可用於鼠類活體內模型之唯一抗體。因此，由該抗體獲得之結果證明為相應申請案中所揭示之所有其他催乳激素受體中和抗體在所分析之疾病模型中的一般功效的代表。

在若干細胞系統中表徵該等抗體以在說明PRLR介導之信號傳導之滅活的不同讀數範例中確定其物種特異性及其效力以及功效(參見實例5-10)。用大鼠Nb2-11細胞(實例6，圖6)或經人類PRLR(實例5，圖5)或鼠類PRLR(實例10，圖10)穩定轉染之Ba/F細胞進行增殖檢定。然而，Novartis抗體XHA 06.983對大鼠及鼠類PRLR不顯示活性，Novartis抗體XHA06.642對大鼠PRLR顯示活性，但對鼠類PRLR不顯示。XHA 06.642抑制人類PRLR介導之信號傳導(實例5、7、8)。相應申請案之新穎抗體006-H08關於經人類PRLR穩定轉染之Ba/F細胞的增殖抑制顯示最高效力(實例5，圖5)。相應申請案之新穎抗體005-C04為對鼠類(實例10、9)及人類PRLR(實例5、7、8)顯示交叉反應性之唯一抗體。因此，與Novartis抗體XHA06.642形成對比，新穎抗體005-C04適用於在鼠類模型中測試對PRLR介導之信號傳導的抑制。本申請案或相應申請案中描述之所有其他抗體對人類PRLR具有特異性。除細胞增殖檢定(實例5、6、10)之外，使用經人類(實例8)或鼠類(實例9)PRLR穩定轉染且在LHRE(催乳激素反應元件)控制下經螢光素酶報導體基

因短暫轉染之HEK293細胞進行螢光素酶報導體檢定。使用該等系統，Novartis抗體XHA06.642不能有效阻斷鼠類PRLR介導之信號傳導再次變得顯而易見(實例9)。相比之下，新穎抗體005-C04(相應申請案)阻斷鼠類PRLR對螢光素酶報導體基因之活化(實例9)。使用人類T47D細胞中之STAT5磷酸化作為額外讀數來分析抗體對人類PRLR之抑制活性(實例7，圖7)。如所預期，非特異性抗體在所有所分析之實驗範例中不具活性。

本發明係關於藉由提供抗PRLR抗體來抑制PRLR陽性細胞之生長及先前提及之良性疾病及適應症之進展的方法。本發明提供特異性結合於PRLR之細胞外域(ECD)(SEQ ID NO: 70)或SEQ ID NO: 70之人類多型變異體的人類單株抗體、其抗原結合片段以及抗體及片段之變異體，諸如描述於PNAS 105 (38), 14533, 2008及J. Clin. Endocrinol. Metab. 95 (1), 271, 2010中之I146L及I76V變異體。

本發明之另一目標在於一種結合於催乳激素受體之細胞外域及其人類多型變異體之抗原決定基的抗體，其中該催乳激素受體之細胞外域之胺基酸序列對應於SEQ ID NO: 70，且核酸序列對應於SEQ ID NO: 71。

本發明之抗體、抗原結合片段以及該等抗體及片段之變異體包含輕鏈可變區及重鏈可變區。本發明中涵蓋之抗體或抗原結合片段之變異體為維持抗體或抗原結合抗體片段對PRLR之結合活性的分子(關於序列，參見表5)。

因此，本發明之一個目標在於一種抗體或抗原結合片

段，其中該抗體或抗原結合片段與抗體002-H08或其特定之成熟變異體競爭。該等抗體及其成熟變異體之序列展示於表5中。

在又一實施例中，揭示一種抗體或抗原結合片段，

- a. 其中可變重鏈及輕鏈區之胺基酸序列在可變重鏈域中與SEQ ID NO: 36之一致性及在可變輕鏈域中與SEQ ID NO: 42之一致性為至少60%，更佳為70%，更佳為80%、或90%，或甚至更佳為95%，或
- b. 其中CDR之胺基酸序列在重鏈域中與SEQ ID NO: 3、9及14之一致性及在可變輕鏈域中與SEQ ID NO: 20、24及31之一致性為至少60%，更佳為70%，更佳為80%，更佳為90%，或甚至更佳為95%。

在一個實施例中，揭示抗體及抗原結合片段，其包含如先前提及之抗體之CDR，其中可變重鏈含有對應於SEQ ID NO: 3、9及14之CDR序列，且可變輕鏈含有對應於SEQ ID NO: 20、24及31之CDR序列。

在一個實施例中，揭示抗體002-H08及抗原結合分段，其中

抗體002-H08包含對應於如SEQ ID NO: 48之核酸序列及如SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的可變重鏈區，

以及具有如SEQ ID NO: 54之核酸序列及如SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的可變輕鏈區。

在又一實施例中，所揭示之抗體或抗原結合片段含有1、2、3、4、5或6個對應於SEQ ID NO: 3、9、14、20、

24及31之CDR。

在本發明之另一實施例中，抗體002-H08由特異性結合於胺基酸序列如SEQ ID NO: 70胺基酸位置1至210所示的PRLR之一或多個區或對該一或多個區具有高親和力的抗原結合區組成，其中該親和力為至少100 nM，較佳為小於約100 nM，更佳為小於約30 nM，甚至更佳為親和力小於約10 nM，或甚至更佳為親和力小於1 nM，或甚至更佳為親和力小於30 pM。

本發明之另一目標在於先前提及之抗體002-H08，其中重鏈恆定區為經修飾或未經修飾之IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

表1提供本發明代表性抗體之解離常數及解離速率之概要，如藉由表面電漿子共振(Biacore)用PRLR之單體細胞外域(SEQ ID NO: 70)對直接固定之抗體所測定。

表1：藉由表面電漿子共振針對抗PRLR人類IgG1分子所測定的表現於HEK293細胞中之人類PRLR之細胞外域的單價解離常數及解離速率

抗體	$K_D[M]$	$K_d[1/s]$
006-H08	0.7×10^{-9}	2.4×10^{-4}
002-H06	2.7×10^{-9}	5.4×10^{-4}
002-H08	1.8×10^{-9}	2.0×10^{-4}
006-H07	2.0×10^{-9}	1.3×10^{-3}
001-E06	15.8×10^{-9}	4.8×10^{-3}
005-C04	12.2×10^{-9}	9.3×10^{-3}
HE06.642	0.3×10^{-9}	3.2×10^{-4}
XHA06.642	1.2×10^{-9}	1.3×10^{-4}
XHA06.983	0.2×10^{-9}	1.7×10^{-4}

使用IgG1格式進行基於細胞之親和力測定，藉由螢光活化細胞分選(FACS)結合Scatchard分析來測定。

表2展示代表性IgG抗體對人類乳癌細胞株T47D及大鼠淋巴瘤細胞株Nb2之結合強度。

表2：如藉由FACS對人類乳癌細胞株T47D及大鼠淋巴瘤細胞株Nb2所測定的抗PRLR抗體之基於細胞之結合效力

抗體	EC ₅₀ [M]	
	T47D	Nb2
006-H08	1.3×10 ⁻⁹	無結合
006-H07	0.4×10 ⁻⁹	無結合
001-E06	1.8×10 ⁻⁹	1.2×10 ⁻³
005-C04	1.9×10 ⁻⁹	0.5×10 ⁻⁹
HE06.642	1.8×10 ⁻⁹	0.9×10 ⁻⁹
XHA06.642	1.5×10 ⁻⁹	1.1×10 ⁻⁹
XHA06.983	0.3×10 ⁻⁹	無結合

抗體產生

為了分離一組能夠在功能上阻斷人類及鼠類PRLR之抗體，並行研究來自Bioinvent(Söderlind等人，2000, Nature BioTechnology. 18, 852-856)且分別表現scFv及Fab片段之稱為n-CoDeR®之合成人類抗體噬菌體呈現庫的兩種格式。用於scFv或Fab選擇之標靶為以經生物素標記(NHS-LC生物素, Pierce)及未經生物素標記之變異體形式採用的人類PRLR之可溶性ECD(SEQ ID NO. 70之胺基酸位置1至210)及小鼠PRLR之可溶性ECD(SEQ ID NO: 72之胺基酸位置1至210)，以及表現PRLR之人類乳癌細胞株T47D。

使用噬菌體呈現技術(PDT)中各種方法之組合且藉由蛋白質及全細胞淘洗之組合及經由開發特定工具來分離高親

和力PRLR特異性人類單株抗體。淘洗工具及篩選方法包括與Fc域融合重組表現之人類及小鼠PRLR之ECD(R&D Systems，目錄號分別為1167-PR及1309-PR；分別為SEQ ID NO: 70及72之位置1-216，各融合於人類IgG1 Fc域，即人類IgG1之位置100至330)；與六組胺酸標記融合重組表現之人類PRLR之細胞外域(SEQ ID NO: 70)；HEK293及鼠類淋巴瘤細胞株Ba/F，各自分別經人類及鼠類PRLR穩定轉染；及乳癌細胞株T47D及大鼠淋巴瘤細胞Nb2，各天然表現PRLR；以及開發能夠鑑別優先結合於呈現於細胞表面上之PRLR且可與小鼠及大鼠之PRLR交叉反應之中和抗體的淘洗程序及篩選檢定(參見實例6及10)。

藉由在ELISA測試中使用重組表現之抗原首先鑑別人類PRLR之結合劑及最終鑑別小鼠PRLR之結合劑來進行篩選。隨後，藉由FACS分析，接著測試該等試劑對細胞內信號傳導之中和活性來檢驗Fab及scFv片段對T47D細胞之細胞結合。出於該目的，測定對PRLR、STAT5及ERK1/2在T47D細胞中之磷酸化的抑制(參見實例14)。使最佳的功能阻斷性scFv及Fab轉化成完全IgG1分子，並在螢光素酶報導體基因檢定中以及在增殖檢定中用依賴於催乳激素生長之細胞來測試其對PRLR之ECD的單價親和力及抑制活性。該等特定方法之組合允許分離作為本發明標的之新穎抗體『002-H08』以及作為相應標的之抗體『006-H08』、『002-H06』、『006-H07』、『001-E06』、『005-C04』。

肽變異體

本發明抗體不限於本文提供之特定肽序列。更確切而言，本發明亦包含該等多肽之變異體。參考本發明及習知可利用的技術及參考文獻，習此相關技藝之人士將能夠製備、測試及利用本文揭示之抗體的功能變異體，同時應瞭解，能夠結合於及在功能上阻斷PRLR之變異體屬於本發明之範疇。

變異體可包括例如與本文揭示之肽序列相比具有至少一個改變之互補決定區(CDR)(高變)及/或構架(FR)(可變)域/位置的抗體。為更好地說明該概念，抗體結構簡述如下。

抗體由兩條肽鏈構成，各含有一個(輕鏈)或三個(重鏈)恆定域及一個可變區(VL、VH)，後者在各情況下由四個FR區(VH：HFR1、HFR2、HFR3、HFR4；VL：LFR1、LFR2、LFR3、LFR4)及三個分散之CDR(VL：LCDR1、LCDR2、LCDR3；VH：HCDR1、HCDR2、HCDR3)構成。抗原結合位點由一或多個CDR形成，而FR區提供CDR之結構構架，且因此，在抗原結合中起重要作用。藉由改變CDR或FR區中之一或多個胺基酸殘基，習此相關技藝之人士按常規可產生突變或多樣化抗體序列，該等序列可例如就新或改良之性質針對抗原加以篩選。

圖12提供對可變域VL及VH中之各胺基酸位置編號的圖解。表3(VH)及4(VL)描繪某些本發明抗體之CDR區且彼此比較及與相應共同或「主控基因」序列比較既定位置之胺基酸，其中CDR區以「X」標記。表5及6幫助給本發明中提供之抗體、抗體片段及PRLR變異體分配SEQ ID號碼。

表 3：VH 序列

					-HCDR1--	
001-E06	VH	QVELLES	GGG	LVQPGG	SLRL SCAASGFTFS	S. YWMSWVRQ APGKGLEWVS
002-H06	VH	QVELLES	GGG	LVQPGG	SLRL SCAASGFTFA	N. YGLTWVRQ APGKGLEWVA
002-H08	VH	QVELLES	GGG	LVQPGG	SLRL SCAASGFTFS	S. YGMHWVRQ APGKGLEWVS
005-C04	VH	EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL SCAASGFTFS	S. YWMHWVRQ APGKGLEWVS
006-H07	VH	QVELLES	GGG	LVQPGG	SLRL SCAASGFTFE	D. HGMSWVRQ APGKGLEWVS
006-H08	VH	QVELLES	GGG	LVQPGG	SLRL SCAASGFTFD	D. YGMSWVRQ APGKGLEWVA
共同		EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL SCAASGFTXX	XXXXXXXXVRQ APGKGLEWVX
					----	HCDR2-----
001-E06	VH	SVSDT.	GTD	HYADSVKGRF	TISRDN	SKNT LYLMQNSLRA EDTAVYYCAK
002-H06	VH	VISFN.	GDKK	YYADSVKGRF	TISRDN	SKNT LYLMQNSLRA EDTAVYYCAS
002-H08	VH	GVSWN.	GSRT	HYADSVKGRF	TISRDN	SKNT LYLMQNSLRA EDTAVYYCAR
005-C04	VH	DISSA.	SSYT	NYADSVKGRF	TISRDN	SKNT LYLMQNSLRA EDTAVYYCAR
006-H07	VH	LISWDD	GSNK	YYADSVKGRF	TISRDN	SKNT LYLMQNSLRA EDTAVYYCAT
006-H08	VH	VISYD.	GSNK	YYADSVKGRF	TISRDN	SQNT LYLMQNSLRA EDTAVYYCAS
共同		XXXXXXXX	XXXX	XXXXXX	XF TISRDN	SKNT LYLMQNSLRA EDTAVYYCXX
					--HCDR3-----	
001-E06	VH	TPLAYSS	GWY	YFDYWGQ	GTL	VTVSS
002-H06	VH	PLES....	PV	AFDIWGQ	GTL	VTVSS
002-H08	VH	G.....	G	DFDYWGQ	GTL	VTVSS
005-C04	VH	GLDA....	R	RMDYWGQ	GTL	VTVSS
006-H07	VH	SLR.....	AT	AFDTWGQ	GTL	VTVSS
006-H08	VH	PLES....	PV	AFDIWGQ	GTM	VIVSS
共同		XXXXXXXX	XXXX	XWQG	GTL	VTVSS

表 4：VL 序列

					---LCDR1-----	
001-E06	VL	DIVLTQPP	SA	SGTPGQR	VTI	SCSGSSSNIG S.NTVN
002-H06	VL	QSVLTQPP	SA	SGTPGQR	VTI	SCSGSSSNIG G.NPVN
002-H08	VL	QSVLTQPP	SA	SGTPGQR	VTI	SCSGSSSNIG S.NDVY
005-C04	VL	QSVLTQPP	SA	SGTPGQR	VTI	SCSGSSSNIG AGYV
006-H07	VL	QSVLTQPP	SA	SGTPGQR	VTI	SCSGSSSNIG N.NAVN
006-H08	VL	DIVLTQPP	SA	SGTPGQR	VTI	SCSGSSSNIG S.NPVN
共同		QSVLTQPP	SA	SGTPGQR	VTI	SCXXXXXXX XXXXXXWYQ
				LCDR2		-----LCDR3--
001-E06	VL	YRNYQRPS	GV	PDRFSGSK	SG TSASLAI	SGL RSEDEADYYC QSYDSSL
002-H06	VL	YGNNSNRPS	GV	PDRFSGSK	SG TSASLAI	SGL RSEDEADYYC QSYDSSL
002-H08	VL	YDNNKRPS	GV	PDRFSGSK	SG TSASLAI	SGL RSEDEADYYC QSYDSSL
005-C04	VL	YRNNQRPS	GV	PDRFSGSK	SG TSASLAI	SGL RSEDEADYYC AAWDDSL
006-H07	VL	YSNNQRPS	GV	PDRFSGSK	SG TSASLAI	SGL RSEDEADYYC AAWDDSL
006-H08	VL	YDNNKRPS	GV	PDRFSGSK	SG TSASLAI	SGL RSEDEADYYC QSYDTGL
共同		YXXXXXXXX	GV	PDRFSGSK	SG TSASLAI	SGL RSEDEADYYX XXXXXXXXXX
				-		
001-E06	VL	SVFGGG	TKLT	VLGQ		
002-H06	VL	SVFGGG	TKLT	VLGQ		
002-H08	VL	WVFGGG	TKLT	VLGQ		
005-C04	VL	WLFGGG	TKLT	VLGQ		
006-H07	VL	WVFGGG	TKLT	VLGQ		
006-H08	VL	WVFGGG	TKLT	VLGQ		
共同		XXFGGG	TKLT	VLGQ		

表 5：抗體序列

抗體	HCDR1		HCDR2		HCDR3		LCDR1		LCDR2		LCDR3		VH 蛋白質		VL 蛋白質		VH 核苷酸		VL 核苷酸	
	SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID	
006-H08	1		7		13		18		24		29		34		40		46		52	
002-H06	2		8		13		19		25		30		35		41		47		53	
002-H08	3		9		14		20		24		31		36		42		48		54	
006-H07	4		10		15		21		26		32		37		43		49		55	
001-E06	5		11		16		22		27		30		38		44		50		56	
005-C04	6		12		17		23		28		33		39		45		51		57	
HE06.642	-		-		-		-		-		-		58		61		64		67	
XHA06.642	-		-		-		-		-		-		59		62		65		68	
XHA06.983	-		-		-		-		-		-		60		63		66		69	

表 6：PRLR 變異體序列

抗體	SEQ ID
人類ECD PRLR(蛋白質)	70
人類ECD PRLR(核苷酸)	71
鼠類ECD PRLR(蛋白質)	72
鼠類ECD PRLR(核苷酸)	73

習此相關技藝之人士可使用表3、4及5中之資料來設計屬於本發明範疇內之肽變異體。較佳的是，藉由改變一或多個CDR區內之胺基酸來構築變異體；變異體亦可能具有一或多個改變之構架區(FR)。舉例而言，肽FR域可能經改變，其中與生殖系序列相比，殘基有偏差。

參考新穎抗體與圖12中所列之相應共同或「主控基因」序列之比較，可改變之候選殘基包括例如以下者：

- VH 006-H08(SEQ ID 34)中位置75處可變為麩醯胺酸(Q)之殘基離胺酸(K)；
- VH 006-H08(SEQ ID 34)中位置108處可變為甲硫胺酸(M)之殘基白胺酸(L)；
- VH 006-H08(SEQ ID 34)中位置110處可變為異白胺酸(I)之殘基蘇胺酸(T)；
- VH 002-H08(SEQ ID 36)中位置67處可變為白胺酸(L)之殘基苯丙胺酸(F)。

此外，變異體可藉由成熟來獲得，亦即藉由使用一個抗體作為最佳化起始點，使抗體中之一或多個胺基酸殘基、較佳為一或多個CDR中之胺基酸殘基多樣化，及篩選所得抗體變異體集合中的具有改良性質之變異體來獲得。尤其較佳為使VL之LCDR3、VH之HCDR3、VL之LCDR1及/或VH之HCDR2中的一或多個胺基酸殘基多樣化。可藉由使用三核苷酸突變誘發(TRIM)技術合成DNA分子集合來進行多樣化 [Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellnhofer, G.及 Moroney S.E. (1994) Trinucleotide

phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucl. Acids Res. 22, 5600]。

保守性胺基酸變異體

可製備保留本文所述之抗體肽序列之整體分子結構的多肽變異體。鑒於個別胺基酸之性質，一些合理的取代將為習此相關技藝之人士所認可。胺基酸取代，亦即「保守性取代」，可例如基於所涉及之殘基之極性、電荷、溶解性、疏水性、親水性及/或兩性性質的類似性來進行。

舉例而言，(a)非極性(疏水性)胺基酸包括丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及甲硫胺酸；(b)極性中性胺基酸包括甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、天冬醯胺及麩醯胺酸；(c)帶正電(鹼性)胺基酸包括精胺酸、離胺酸及組胺酸；及(d)帶負電(酸性)胺基酸包括天冬胺酸及麩胺酸。取代通常可在組(a)-(d)內進行。另外，甘胺酸及脯胺酸可基於其破壞 α 螺旋之能力經彼此取代。類似地，某些胺基酸，諸如丙胺酸、半胱胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸及離胺酸更通常可在 α 螺旋中發現，而纈胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸及蘇胺酸更通常可在 β 摺疊片中發現。甘胺酸、絲胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺及脯胺酸通常在轉折中發現。一些較佳取代可在以下組中進行：(i) S與T；(ii) P與G；及(iii) A、V、L及I。鑒於已知遺傳密碼及重組及合成DNA技術，有經驗的科學家可容

易地構築編碼保守性胺基酸變異體之DNA。

如本文所使用，兩個多肽序列之間的「序列一致性」指示序列之間相同的胺基酸所佔之百分比。「序列同源性」指示相同或表示保守性胺基酸取代之胺基酸所佔的百分比。本發明之較佳多肽序列在CDR區中的序列一致性為至少60%，更佳為至少70%或80%，又更佳為至少90%，且最佳為至少95%。較佳抗體在CDR區中之序列同源性亦為至少80%，更佳為90%且最佳為95%。

本發明之DNA分子

本發明亦係關於編碼本發明抗體之DNA分子。該等序列包括(但不限於)如SEQ ID NO 48、54中所示之彼等DNA分子。

本發明之DNA分子不限於本文所揭示之序列，而是亦包括其變異體。本發明內之DNA變異體可參考其在雜交中之物理性質來描述。習此相關技藝之人士應認識到，可使用DNA，利用核酸雜交技術來鑑別其互補序列，且因為DNA為雙股，所以可鑑別其等效物或同源物。亦應認識到，雜交可在小於100%之互補性下發生。然而，倘若適當選擇條件，則雜交技術可用於基於與特定探針之結構相關性區分DNA序列。關於該等條件之指南，參見Sambrook等人，1989[Sambrook, J., Fritsch, E. F.及Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA)]及Ausubel等人，1995[Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.

E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A.及Struhl, K. 編, (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons]。

兩個聚核苷酸序列之間的結構相似性可表示為兩個序列將彼此雜交所處之條件之「嚴格度」的函數。如本文所使用，術語「嚴格度」係指條件不利於雜交之程度。嚴格條件極不利於雜交，且僅結構最相關之分子方在該等條件下彼此雜交。反之，非嚴格條件有利於展現較小結構相關度之分子雜交。因此，雜交嚴格度與兩個核酸序列之結構關係直接相關。以下關係適用於將雜交與相關性相關聯(其中 T_m 為核酸雙鏈體之熔融溫度)：

a. $T_m = 69.3 + 0.41(G+C)\%$

b. 錯配鹼基對之數目每增加1%，雙鏈體DNA之 T_m 降低 1°C 。

c. $(T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18.5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$

其中 $\mu 1$ 及 $\mu 2$ 為兩個溶液之離子強度。

雜交嚴格度隨許多因素而變化，包括整體DNA濃度、離子強度、溫度、探針尺寸及存在破壞氫鍵結合之試劑。促進雜交之因素包括高DNA濃度、高離子強度、低溫、較長探針尺寸及不存在破壞氫鍵結合之試劑。雜交通常分兩期進行：「結合」期及「洗滌」期。

首先，在結合期中，探針在有利於雜交之條件下結合於標靶。在該階段，通常藉由改變溫度來控制嚴格度。對於高嚴格度，除非使用短(<20 nt)之寡核苷酸探針，否則溫

度通常在65°C與70°C之間。代表性雜交溶液包含6×SSC、0.5% SDS、5×登哈特氏溶液(Denhardt's solution)及100 µg非特異性載體DNA[參見Ausubel等人，2.9章節，增刊27(1994)]。當然，已知許多不同但功能等效之緩衝條件。當相關度較低時，可選擇較低溫度。低嚴格度結合溫度在約25°C與40°C之間。中嚴格度在至少約40°C與小於約65°C之間。高嚴格度為至少約65°C。

其次，藉由洗滌來移除過量探針。在該洗滌期時，通常應用更嚴格的條件。因此，該「洗滌」階段在經由雜交測定相關性時最為重要。洗滌溶液通常含有較低鹽濃度。一種例示性中嚴格度溶液含有2×SSC及0.1% SDS。高嚴格度洗滌溶液含有少於約0.2×SSC之等效物(離子強度)，其中較佳嚴格溶液含有約0.1×SSC。與各種嚴格度相關之溫度與上文關於「結合」所論述相同。在洗滌期間，洗滌溶液通常亦更換若干次。舉例而言，典型的高嚴格度洗滌條件包含在55°C下洗滌兩次，持續30分鐘，及在60°C下洗滌三次，持續15分鐘。

因此，本發明之目標在於一種分離之核酸序列，其編碼本發明之抗體及抗原結合片段。

本發明之另一實施例為先前提及之分離之核酸序列，其編碼本發明之抗體，其中該等核酸序列如表5中所示。

因此，本發明包括在高嚴格度結合及洗滌條件下與如表5所示之分子雜交的核酸分子，其中該等核酸分子編碼具有本文所述之性質的抗體或其功能片段。較佳分子(自

mRNA觀點而言)為彼等與本文所述之DNA分子之一的同源性或序列一致性為至少75%或80%(較佳為至少85%，更佳為至少90%且最佳為至少95%)之分子。該等分子阻斷催乳激素受體介導之信號傳導。

功能等效變異體

本發明範疇內之另一類DNA變異體可參考其編碼之產物進行描述。該等功能等效基因之特徵在於歸因於遺傳密碼之簡併性，其編碼SEQ ID No: 34-45中所示之相同肽序列的事實。

應認識到，本文提供之DNA分子之變異體可以若干不同方式構築。舉例而言，其可構築成完全合成之DNA。可廣泛利用能有效合成處於20至約150個核苷酸範圍內之寡核苷酸之方法。參見Ausubel等人，2.11章節，增刊21 (1993)。重疊的寡核苷酸可以最初由Khorana等人，J. Mol. Biol. 72:209-217 (1971)所報導之方式合成及裝配；亦參見Ausubel等人，同上，8.2章節。合成的DNA較佳經設計而具有在基因之5'及3'端處經工程改造之適宜限制位點以有利於選殖於適當載體中。

如所指示，產生變異體之方法在於以本文所揭示之DNA之一起始，隨後進行定點突變誘發。參見Ausubel等人，同上，第8章，增刊37 (1997)。在典型方法中，將標靶DNA選殖於單股DNA噬菌體媒介中。分離出單股DNA且與含有所需核苷酸變化之寡核苷酸雜交。合成互補股，且將雙股噬菌體引入宿主中。一些所得子代將含有所需突變

體，其可使用DNA測序來證實。另外，可利用各種增加子代噬菌體將為所需突變體之幾率的方法。該等方法為熟習此項技術者所熟知，且用於產生該等突變體之套組可自市面上購得。

重組DNA構築體及表現

本發明進一步提供包含本發明之一或多個核苷酸序列的重組DNA構築體。本發明之重組構築體與載體相結合使用，該載體諸如有質體、噬菌粒、噬菌體或病毒載體，在該載體中插入編碼本發明抗體之DNA分子。

編碼基因可藉由Sambrook等人，1989及Ausubel等人，1989中所述之技術產生。或者，DNA序列可使用例如合成儀化學合成。參見例如OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (1984, Gait編，IRL Press, Oxford)中所述之技術，該文獻以全文引用之方式併入本文中。此項技術之專家能夠融合編碼各種人類IgG同型或其突變或未突變衍生物之可變域之DNA與編碼其恆定區之基因片段。能夠應用重組DNA技術以使用連接子使兩個可變域融合成單鏈格式，該等連接子諸如有15個胺基酸的片段，其含有三個甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-絲胺酸。本發明之重組構築體與能夠表現RNA及/或編碼DNA之蛋白質產物的表現載體包含在一起。載體可進一步包含調控序列，包括可操作地連接於開放閱讀構架(ORF)之啟動子。載體可進一步包含可選擇的標記物序列。特異性起始及細菌分泌信號亦可為有效轉譯插入之標靶基因編碼序列所需。

本發明進一步提供含有至少一種本發明之DNA的宿主細胞。宿主細胞可為幾乎任何可利用表現載體之細胞。其可為例如較高等真核宿主細胞，諸如哺乳動物細胞；較低等真核宿主細胞，諸如酵母細胞，且可為原核細胞，諸如細菌細胞。引入重組構築體於宿主細胞中可利用磷酸鈣轉染、DEAE、葡聚糖介導之轉染、電穿孔或噬菌體感染來實現。

細菌表現

藉由插入編碼所需蛋白質之結構DNA序列連同與功能啟動子處於可操作閱讀相中之適合轉譯起始及終止信號來構築適用於細菌使用之表現載體。載體將包含一或多個表型可選擇標記物及複製起點以確保維持載體且必要時在宿主內提供擴增。適於轉型之原核宿主包括大腸桿菌 (*E. coli*)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠傷寒沙門菌 (*Salmonella typhimurium*)及假單胞桿菌屬、鏈黴菌屬及葡萄球菌屬內之各種物種。

細菌載體可例如基於噬菌體、基於質體或基於噬菌粒。該等載體可含有源自通常含有熟知選殖載體 pBR322(ATCC 37017)之元件的可自市面上購得之質體的可選擇標記物及細菌複製起點。在轉型適合之宿主菌株且使宿主菌株生長至適當細胞密度後，利用適當方法(例如，溫度變動或化學誘導)去阻遏/誘導所選擇的啟動子，且將細胞再培養一段時間。通常利用離心收集細胞，利用物理或化學方法破壞細胞，且保留所得粗提取物用於進一步純化。

在細菌系統中，視所表現之蛋白質之預定用途而定，宜選擇許多表現載體。舉例而言，當需產生大量該類蛋白質例如用於產生抗體或篩選肽庫時，可能需要能引導可容易地純化之融合蛋白質產物之高量表現的載體。

因此，本發明之一目標在於一種表現載體，其包含編碼新穎的本發明抗體之核酸序列。

哺乳動物表現及純化

用於哺乳動物宿主細胞表現之較佳調控序列包括在哺乳動物細胞中引導高量蛋白質表現之病毒元件，諸如源自巨細胞病毒(CMV)(諸如CMV啟動子/強化子)、猿猴病毒40(SV40)(諸如SV40啟動子/強化子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多形瘤之啟動子及/或強化子。關於病毒調控元件及其序列之進一步描述，參見例如Stinski之U.S. 5,168,062、Bell等人之U.S. 4,510,245及Schaffner等人之U.S. 4,968,615。重組表現載體亦可包括複製起點及可選擇的標記物(參見例如Axel等人之U.S. 4,399,216、4,634,665及U.S. 5,179,017)。適合的可選擇標記物包括賦予已引入有載體之宿主細胞耐藥(諸如G418、潮黴素或甲胺喋呤)性的基因。舉例而言，二氫葉酸還原酶(DHFR)基因賦予耐甲胺喋呤性，且neo基因賦予耐G418性。

將表現載體轉染於宿主細胞中可使用標準技術進行，諸如電穿孔、磷酸鈣沈澱及DEAE-葡聚糖轉染。

適於表現本文提供之抗體、抗原結合部分或其衍生物之

哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)[包括 dhfr-CHO 細胞，描述於 Urlaub 及 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 中，與 DHFR 可選擇標記物一起使用，例如 R. J. Kaufman 及 P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621 中所述]、NSO 骨髓瘤細胞、COS 細胞及 SP2 細胞。在一些實施例中，表現載體經設計以使表現之蛋白質分泌於宿主細胞生長所在之培養基中。可使用標準蛋白質純化方法自培養基中回收抗體、抗原結合部分或其衍生物。

可利用熟知方法自重組細胞培養物中回收及純化本發明之抗體或其抗原結合片段，該等方法包括(但不限於)硫酸銨或乙醇沈澱、酸萃取、蛋白質 A 層析、蛋白質 G 層析、陰離子或陽離子交換層析、磷酸基-纖維素層析、疏水性相互作用層析、親和層析、羥基磷灰石層析及凝集素層析。亦可採用高效液相層析(「HPLC」)進行純化。參見例如 Colligan, Current Protocols in Immunology 或 Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)，例如第 1、4、6、8、9、10 章，各以全文引用之方式併入本文中。

本發明之抗體或其抗原結合片段包括天然純化之產物、化學合成程序之產物、及藉由重組技術自真核宿主(包括例如酵母、高等植物、昆蟲及哺乳動物細胞)產生之產物。視重組產生程序中所採用之宿主而定，本發明之抗體可經糖基化或可未經糖基化。該等方法描述於許多標準實

驗手冊上，諸如 Sambrook，同上，17.37-17.42 章節；Ausubel，同上，第10、12、13、16、18及20章。

因此，本發明之一個目標亦在於宿主細胞，其包含載體或核酸分子，其中該宿主細胞可為較高等真核宿主細胞，諸如哺乳動物細胞；較低等真核宿主細胞，諸如酵母細胞；且可為原核細胞，諸如細菌細胞。

本發明之另一目標在於一種使用宿主細胞來產生抗體或抗原結合片段的方法，該方法包含在適合之條件下培養該宿主細胞及回收該抗體。

因此，本發明之另一目標在於用本發明之宿主細胞產生且已純化至至少95重量%均質性的本發明所述之抗體。

子宮內膜異位症及子宮腺肌症(子宮內子宮內膜異位)

子宮內膜異位症為良性的雌激素依賴性婦科病症，以子宮腔外部存在子宮內膜組織(腺及基質)為特徵。子宮內膜異位病灶主要在骨盆腹膜上、卵巢及直腸陰道隔中發現(Obstet. Gynecol. Clin. North. Am. 24:235-238, 1997)。子宮內膜異位症時常與不孕及疼痛症狀(諸如痛經)有關。另外，許多患者罹患自體免疫疾病(Hum. Reprod. 17(19): 2715-2724, 2002)。亦稱為子宮內子宮內膜異位之子宮腺肌症描述限於子宮中之子宮內膜異位症之一種衍生形式。在子宮腺肌症之情況下，子宮內膜腺侵入子宮肌層及子宮壁。

根據移植理論，在患者與健康女性中，子宮內膜片段因逆行月經而沖入至腹膜腔中(Obstet. Gynecol. 64:151-154,

1984)。四個主要因素似乎與患者骨盆腔中子宮內膜異位病灶的成功形成密切相關：

- a) 在月經週期分泌後期，健康女性之子宮內膜細胞凋亡。在患者中，子宮內膜細胞之凋亡程度明顯下降 (Fertil. Steril. 69:1042-1047, 1998)。因此，在患者中，已因逆行月經沖入腹膜腔中之子宮內膜片段不死亡且成功植入的概率比健康女性高。
- b) 為使異位子宮內膜片段成功植入腹膜中並長期存活，不得不形成新血管 (British Journal of Pharmacology, 149:133-135, 2006)。
- c) 許多患者罹患自體免疫疾病，且具有缺乏抵抗力的免疫系統 (Hum. Reprod. 17(19): 2002, 2715-2724, 2002)。此可得出以下結論，健康女性中所存在之完整免疫反應可在防止子宮內膜異位病灶之形成方面起作用。
- d) 病變不得不生長，且因此取決於促有絲分裂刺激及生長因子之存在。

為了治療子宮內膜異位症，目前存在以下方法：

- a) 促性腺激素釋放激素 (GnRH) 模擬物：抑制卵巢雌二醇合成及誘導關鍵依賴於雌二醇之存在來生長之異位子宮內膜異位植入物萎縮。
- b) 芳香酶抑制劑：由子宮內膜異位植入物抑制雌二醇之局部產生，誘導凋亡及抑制異位子宮內膜異位片段之增殖。

- c) 選擇性雌激素受體調節劑：在正常子宮內膜及異位植入物中具有雌激素受體拮抗活性，且因此引起植入之異位子宮內膜異位組織萎縮。
- d) 助孕酮受體促效劑：抑制正常及異位子宮內膜細胞增殖，誘導分化及凋亡。
- e) 組合口服避孕藥：維持現狀，阻止疾病進展，及誘導異位及正位子宮內膜萎縮。
- f) 外科手術切除病變。

GnRH類似物、SERM及芳香酶抑制劑具有嚴重副作用且在患有子宮內膜異位症之年輕女性中引起熱潮紅及骨質流失。用助孕酮受體促效劑治療引起排卵抑制、不規律月經出血而後為閉經、體重增加及抑鬱。歸因於靜脈血栓栓塞之風險增加，故組合口服避孕藥不適用於大於35歲之女性、吸煙者及體重超重之個體。外科手術切除病灶傾向於復發率高。

本發明抗體干擾由垂體產生及局部產生催乳激素所刺激或因活化PRLR突變所致的PRLR介導之信號傳導，且因此比僅干擾垂體催乳激素分泌之多巴胺-2受體促效劑有效。

PRL及PRLR表現於子宮中且在正常子宮生理學中起作用；PRL可充當有效的有絲分裂原且具有免疫調節作用。在本發明中，已證實PRL/PRLR系統之變化在人類子宮內膜異位症中起作用。利用定量Taqman PCR對PRL及PRLR在健康女性之子宮內膜及患者之子宮內膜及病灶中之表現的分析(參見實例2)展示於圖1及2中。

如圖 1(PRL 表現)及圖 2(PRLR 表現)中所示，PRL 與其受體在子宮內膜異位病灶中被大幅上調。該發現初次產生以下的實驗證據：自分泌 PRL 信號傳導可在子宮內膜異位病灶之形成、生長及維持中起基本作用。

PRLR 抗體已在子宮內子宮內膜異位動物模型(亦即小鼠子宮腺肌症模型)中被成功測試(參見實例 20)。子宮腺肌症之特徵在於子宮內膜腺體在子宮內膜之子宮肌層中浸潤性生長。此類似子局限於子宮中之子宮內膜異位症形式，即非行經物種可能患上之子宮內膜異位症之唯一形式。在患有子宮內膜異位症之患者之臨床治療中有效的達那唑(Danazol)亦能有效治療子宮腺肌症(Life Sciences 51:1119-1125, 1992)。然而，達那唑為雄激素助孕素且在年輕女性中產生嚴重的雄激素副作用，此限制其使用。

本發明抗體可解決該問題，從而提供新的子宮內膜異位症治療或預防法，且展現比現行標準療法少之副作用。

因此，本發明之另一態樣在於採用 PRLR 中和抗體及抗原結合片段來治療或預防子宮內膜異位症及子宮腺肌症(子宮內子宮內膜異位)。

本發明之另一態樣在於使用本發明所述之抗體及抗原結合片段來治療或預防子宮內膜異位症及子宮腺肌症(子宮內子宮內膜異位)。

雌性非激素性避孕

目前雌性避孕之方法如下：

- a) 含有雌激素及助孕素之組合口服避孕藥。

助孕素組分經由向下丘腦-垂體-性腺軸提供負反饋介導避孕作用。雌激素組分保證良好出血控制，且經由在標靶細胞中誘導助孕酮受體增強促孕作用。

b) 僅含助孕素之子宮內裝置。

局部釋放之助孕素使子宮內膜呈抗植入狀態。另外，子宮頸黏膜變得對精細胞而言幾乎不滲透。

c) 僅助孕素之藥丸及植入物。

助孕素經由向下丘腦-垂體-性腺軸提供負反饋抑制排卵。另外，子宮頸黏膜對精細胞之滲透性減小。

d) 含有炔雌醇加助孕素之陰道環

組合口服避孕藥之主要副作用為靜脈血栓栓塞(VTE)風險升高。此外，超重或吸煙女性以及患有自體免疫疾病(諸如狼瘡)之女性及大於35歲之女性不能使用口服組合避孕藥。

僅含助孕素之子宮內裝置及植入物會導致異常子宮出血。

僅助孕素之藥丸可導致不規律出血模式、血斑、閉經。異位妊娠風險增加。體重增加及骨質密度減小為其他副作用。

陰道環會導致陰道炎、白帶或排出。

幾年前已產生PRLR缺陷小鼠(Genes Dev 11:167-178, 1997)。有趣的是，PRLR缺陷雌性小鼠完全不孕，但雄性小鼠則不然。PRLR^{-/-}雌性展現受精後卵發育立即停滯，亦即其展示植入前發育停滯。僅極少數卵母細胞達到囊胚

期，且不能植入突變雌性中，但在野生型養母中在移植後發育成正常胚胎。PRLR缺陷小鼠之不孕症表型可藉由補充助孕酮來援救直至妊娠中期。顯然，PRLR介導之信號傳導在產生允許及維持妊娠所必需之助孕酮之黃體的維持及功能中發揮重要作用。另外，PRLR缺陷雌性展現與腹部脂肪質量減少及瘦素含量相關之體重減輕，但雄性則不然。

迄今為止，尚未知失活人類PRLR突變，因此PRLR介導之信號傳導在人類生育力中之精確作用仍未知。然而，越來越多的證據表明，在人類中亦需要最低催乳激素含量來達成成功妊娠。用溴麥角環肽(bromocriptin)治療患有由高催乳激素血症性黃體功能不全所致之原發性不孕症的患者。在一些情況下，催乳激素含量受過度抑制，且縮短之黃體期再次重現(Bohnet HG等人，Lisuride and other dopamine agonists, D.B. Calne等人編，Raven Press, New York, 1983)。由該等資料推斷，高催乳激素狀態及低催乳激素狀態負面干擾雌性生育力。此可由PRL與其受體之相互作用得以說明。在低催乳激素含量之情況下，無充分的受體活化、而在高催乳激素血症之情況下，亦無充分的受體活化，因為所有受體由催乳激素分子阻斷且不再能二聚合。換言之，催乳激素之劑量反應為鐘形，且最佳受體活化僅在一定濃度範圍內達成。第二研究有證據表明，患者中缺乏子宮內膜催乳激素表現導致早期植入失敗(Human Reprod. 19:1911-1916, 2004)。此外，已展示催乳激素可離

體預防培養之人類顆粒細胞凋亡，且因此維持早期黃體功能，此已在PRLR缺陷小鼠中得以證明(Human Reprod. 18:2672-2677, 2003)。

為測試PRLR中和抗體之避孕功效，用特異性及非特異性PRLR抗體注射小鼠且如實例11中所述與雄性交配。其讀數為每處理組之窩數及每動物之窩仔數。圖11中所呈現之實驗證明，用本發明之中和抗體處理當在每公斤體重30 mg下測試時完全預防小鼠妊娠。

與先前提及之標準方法相比，用PRLR中和抗體之雌性避孕具有若干優點：

- 抗體可用於吸煙、超重及老年女性中以及患有紅斑狼瘡之女性中(PRLR抗體甚至可有益於治療狼瘡及減少腹部脂肪，亦即PRLR缺陷小鼠具有較少腹部脂肪)。

- PRLR抗體不使VTE(靜脈血栓栓塞)風險升高

- 與組合口服避孕藥中使用之雌激素及助孕素形成對比，PRLR介導之信號傳導引起乳房上皮細胞增殖受抑制，且與生育控制之激素方法形成對比，甚至可預防使用者患乳癌。

本發明之另一目標在於使用PRLR中和PRLR抗體及抗原結合片段用於雌性避孕，且與標準療法相比，副作用減少。

本發明之另一態樣在於使用如本發明所述之抗體及抗原結合片段用於雌性避孕，且與標準療法相比，副作用減少。

良性乳房疾病及乳腺痛

良性乳房疾病涵蓋多種症狀，諸如纖維囊性乳房疾病、纖維腺瘤、乳腺痛及大包囊。30-50%絕經前女性患有纖維囊性乳房疾病(Epidemiol Rev 19:310-327, 1997)。視女性年齡而定，良性乳房疾病可呈現有獨特的表型(J Mammary Gland Biol Neoplasia 10:325-335, 2005)：在生殖早期期間(15-25歲)，當正常乳房發生小葉發育時，良性乳房疾病產生纖維腺瘤。觀測到單一巨型纖維腺瘤以及多種腺瘤。該等纖維腺瘤由基質以及上皮細胞構成且由小葉產生。在成熟生殖期中(25-40歲)，乳房在各月經週期期間，發生週期性變化。患病女性呈現有週期性乳腺痛及在乳房中有若干結節。後來(35-55歲)，正常乳房退化，而在患病者中，可觀測到乳房大包囊及上皮增生，伴有及不伴有異形性。伴隨上皮細胞增殖增強之良性乳房疾病之彼等形式患上乳癌之風險較高。若增殖細胞部分中存在細胞異形性，則該風險可高達11%(Zentralbl Gynäkol 119:54-58,1997)。25% 60-80歲大之女性亦會患良性乳房疾病，雌激素替代療法或肥胖通常為絕經後持續性良性乳房疾病之原因(Am J Obstet Gynecol 154:161-179, 1986)。

纖維囊性乳房疾病之病理生理學由雌激素優勢及導致結締組織過度增殖(纖維化)繼而兼性上皮細胞增殖之助孕酮缺乏決定。如早已提及，乳腺癌在展現纖維囊性病灶內上皮細胞增殖增強之患者中風險升高。臨床纖維囊性乳房疾病呈現有乳房疼痛及乳房觸痛。70%患有纖維囊性乳房疾

病之患者患有黃體功能不全或排卵停止 (Am J Obstet 154:161-179, 1986)。黃體功能不全導致助孕酮含量減少及雌激素優勢。

乳腺痛(乳房疼痛)對約70%之女性在生殖生命期之某段時間產生影響。乳房疼痛可能與或可能不與經前症候群之其他標準相關。已證明，患有乳腺痛之女性作出刺激下丘腦垂體軸後釋放過量催乳激素的反應 (Clin Endocrinol 23:699-704, 1985)。

良性乳房疾病及乳腺痛之標準療法為：

1) 溴麥角環肽

作為多巴胺促效劑之溴麥角環肽僅阻斷垂體催乳激素合成，但不阻斷乳腺上皮細胞中催乳激素之局部合成。因此，其僅在彼等依賴於升高之全身性催乳激素含量之乳腺痛及良性乳房疾病形式中有效。溴麥角環肽之主要副作用為：

噁心、嘔吐、水腫、低血壓、眩暈、毛髮減少、頭痛及幻覺

2) 達那唑

達那唑為雄激素助孕素，經由其抗促性腺激素活性抵消良性乳房疾病中所觀測到之雌激素優勢。主要副作用為：

月經不規律、抑鬱、痤瘡、多毛症、聲音深沉及熱潮紅以及體重增加。

3) 他莫昔芬(tamoxifen)

他莫昔芬為選擇性雌激素受體調節劑，在乳房中具有抗

雌激素活性且在子宮中具有雌激素活性。主要副作用為：

絕經後症狀，諸如骨質流失及熱潮紅、卵巢囊腫及子宮內膜癌瘤。

4)助孕素

助孕素經由抑制垂體性腺軸、抑制排卵及耗盡雌激素來抑制良性乳房疾病。雌激素耗盡產生絕經症狀，諸如骨質流失及熱潮紅。

5)低劑量組合口服避孕藥

該治療不適用於大於35歲女性、吸煙女性以及糖尿病性及超重患者。

一般而言，已發現在三分之一之患有良性乳房疾病之女性中催乳激素含量增加。因為雌激素增強垂體催乳激素分泌，所以已認為在該疾病中，血清催乳激素含量增加為雌激素佔優勢之結果。已報導，活化PRLR突變通常存在於患有多種乳房腺瘤(類似纖維囊性乳房疾病亞型)之女性中(Paul Kelly, Breast Congress Turin, 2007，及Proc Natl Acad Sci 105: 14533-14538; 2008)。

良性乳房疾病、乳腺痛及經前乳房緊張依賴於一種常見生理疾病機制：催乳激素信號傳導增強。升高之催乳激素信號傳導可為以下之結果：

- 全身性高催乳激素血症(歸因於垂體腺瘤)
- 局部高催乳激素血症(歸因於增殖乳腺上皮細胞中之催乳激素合成)。局部高催乳激素血症不轉化成血液中升高之催乳激素含量。

- 在正常催乳激素含量存在下之組成性活性PRLR信號傳導(歸因於活化PRLR突變)。

鑒於良性乳房疾病之某些形式會產生乳腺癌，故對治療該疾病存在醫學需要。

為證明PRLR中和抗體在良性乳房疾病之臨床前模型中之功效，採用基於全身性高催乳激素血症之小鼠模型。如實例16中所述，在腎包膜下給成年Balb/c小鼠移植垂體同源移植物(Methods in Mammary gland Biology and Breast Cancer Research, 101-107, 2000)。與未處理原始對照小鼠相比，全身性高催乳激素血症導致乳腺中之上皮細胞增殖增強，且刺激側邊分枝及小葉腺泡發育。具有較高患癌風險之人類纖維囊性乳房疾病之大多數嚴重形式的特徵在於上皮細胞增殖增強。如在實例16中所述，與非特異性抗體相比，就以下能力在Balb/c小鼠模型中測試PRLR中和抗體：

- 阻斷側邊分枝及小葉腺泡發育
- 抑制乳腺上皮細胞增殖
- 抑制STAT5之磷酸化，STAT5為通常在PRLR活化後活化及磷酸化之轉錄因子。

如圖15A-C中所證明，PRLR中和抗體以劑量依賴性方式阻斷所有以上提及之讀數範例。

本發明之另一目標在於使用PRLR中和抗體及抗原結合片段治療絕經前及絕經後女性之良性乳房疾病及乳腺痛。

本發明之另一態樣在於使用如本發明所述之抗體及抗原

結合片段治療絕經前及絕經後女性之良性乳房疾病及乳腺痛。

泌乳抑制

催乳激素為分娩後泌乳所涉及之主要激素。此由PRLR缺陷小鼠之表型得到證明。即使雜合小鼠亦具有嚴重的哺乳問題，且完全不能給其後代餵奶(Frontiers in Neuroendocrinology 22:140-145, 2001)。

出於許多原因，女性不得不停止母乳餵養，亦即母體攝入藥物對幼兒有潛在危險、嚴重感染(乳房炎、腎炎)、產後大出血及嚴重母體疾病(諸如糖尿病、癌)以及新生兒體弱或疾病。目前，使用多巴胺受體促效劑(諸如溴麥角環肽及麥角乙脲)抑制分娩後泌乳。然而，該等化合物可引發嚴重的副作用，諸如噁心、嘔吐、水腫、低血壓、眩暈、毛髮減少、頭痛及幻覺。另外，多巴胺受體促效劑不適用於患有心血管疾病及高血壓之女性。溴麥角環肽之另一缺點為其半衰期短，從而需要在14天之時間裏，每日攝入藥物4-6次。

為測試催乳激素受體中和抗體在小鼠中之功效，使NMRI小鼠與雄性交配。出生後，調整窩仔數為8隻動物，且如實例15中所述，用針對PRLR之特異性及非特異性抗體處理雌性。作為母體泌乳能力之量度，每日監測後代之重量。其讀數詳細描述於實例15中，且結果展示於圖14A-D中。PRLR中和抗體展示泌乳之抑制係劑量依賴性，且引起乳腺退化且乳汁蛋白質產生減少。

本發明之另一目標在於使用PRLR中和抗體抑制泌乳。

本發明之另一目標在於使用本發明所述之抗體及抗原結合片段抑制泌乳。

良性前列腺增生

良性前列腺增生(BPH)為第四大老年男性流行衛生保健病狀。前列腺腫大為影響大於50%之50歲及50歲以上之男性的與年齡相關之進行性病狀。BPH之特徵在於前列腺基質及上皮細胞增生，從而在前列腺尿道周區中形成壓縮尿道之大離散結節。因此，尿流量減小為BPH之一個主要結果。

BPH之標準療法涵蓋：

a) $\alpha 1$ 腎上腺素能受體拮抗劑(例如他蘇洛辛(tamsulosin)、阿夫唑嗪(alfuzosin)、特拉唑嗪(terazosin)、多沙唑嗪(doxazosin))減輕下尿路之BPH症狀。其藉由阻斷 α 受體介導之前列腺平滑肌刺激降低膀胱出口阻塞。主要副作用為血管擴張不良事件、眩暈及射精失敗。

b) 5 α -還原酶抑制劑(例如非那雄安(finasteride))

5 α -還原酶抑制劑阻止二氫睪固酮形成，二氫睪固酮為睪酮在前列腺中之活性形式，其造成前列腺腫大。主要副作用為性功能障礙，諸如勃起病症及性慾降低。

c) 經尿道前列腺切除(TURP)

該外科手術治療與高發病率相關聯。副作用為出血、

失禁、狹窄形成、射精損失及膀胱穿孔。

d) 前列腺支架

在尿道前列腺部分插入支架以保證適當的尿流量。主要副作用為結垢、尿路感染及支架遷移。此外，在任何經尿道操作之前，必須移除支架。

如關於乳腺所述，PRL及PRLR在前列腺內以自分泌/旁分泌方式起作用(J. Clin. Invest. 99:第618頁，1997)。

臨床研究指示高催乳激素血症(及肢端肥大症)與前列腺腫大及發炎性細胞之基質積聚相關聯。人類生長激素在鋅存在下可結合人類PRLR，此可解釋為何肢端肥大症會導致良性前列腺增生。在BPH患者中，PRL血清含量通常升高。

普遍過度表現PRL基因之轉殖基因動物顯現嚴重的基質前列腺增生，表明PRL為患上前列腺增生之重要生理病原性因素(Endocrinology 138：第4410頁，1997)。此外，在轉殖基因小鼠中，在前列腺特異性probasin啟動子下局部過度表現PRL導致基質膨脹、發炎性細胞積聚及病灶上皮細胞發育異常，此為人類BPH之基本特徵(Endocrinology 144:第2269頁，2003)。

PRLR高度表現於前列腺中(實例3，圖3)。在激素耗盡及處理後，在大鼠前列腺組織中觀測到PRLR蛋白質表現之變化(實例4，圖4)。除PRLR以外，前列腺細胞亦表現催乳激素。

如實例17中所述，雄性Balb/c小鼠在腎包膜下接受垂體

同源移植物且顯現良性前列腺增生。在該模型中測試催乳激素受體中和抗體及非特異性抗體對良性前列腺增生之作用。其讀數範例描述於實例17中。如圖16中所示，PRLR中和抗體抑制良性前列腺生長，且因此適用於治療良性前列腺增生。

本發明之另一目標在於使用PRLR中和抗體及抗原結合片段治療良性前列腺增生。

本發明之另一態樣在於使用本發明所述之抗體及抗原結合片段治療良性前列腺增生。

高催乳激素血症性毛髮減少

毛髮減少治療之需要仍未得到滿足。週期中之頭皮毛髮生長：生長期之特徵在於活性毛髮生長，退化期顯示退化，接著為休眠期(靜止)。外生期(死亡毛髮脫落)與休眠期之末尾一致。毛髮減少可為任何期毛髮生長受擾亂之結果。

休眠期毛髮減少可具有許多觸發原因(生理學及情緒壓力、醫學病狀、缺鐵及缺鋅)，重要的是，早期雄激素禿頭展示休眠期毛髮排出(Cleveland clinic journal of medicine 2009; 76:361-367)。生長期毛髮減少通常為放療或化療之結果。

敏樂定(Minoxidil)及非那雄安(Finasteride)用於治療雄激素毛髮減少，而糖皮質類固醇用於斑禿。一般而言，所有該等治療均具有副作用(非那雄安：男性性慾降低及陰萎，糖皮質類固醇：糖尿病、體重增加、骨質疏鬆)，且

治療毛髮減少之問題尚未完全解決。

在齧齒動物中，使用成年動物之剃毛實驗藉由使用剃毛區域中毛髮再生長作為讀數範例分析化合物對毛髮減少之作用(British Journal of dermatology 2008; 159:300-305)。剃毛成年動物(毛髮通常處於休眠期)誘導以毛髮生長為特徵之生長期。

在實例17中所述之實驗(良性前列腺增生)中，為接受垂體同源移植物之動物剃毛。在該等實驗過程中，出乎意料地發現，接受垂體同源移植物之動物展示剃毛區域中之毛髮再生長嚴重受損。用PRLR中和抗體治療刺激毛髮生長，而非特異性抗體則不然(圖17)。

該觀測結果證明，毛髮減少中涉及催乳激素受體介導之信號傳導升高。為對此進行更詳細的分析，進行極類似先前描述之實驗的其他剃毛實驗(British Journal of dermatology 2008; 159:300-305)。該等其他剃毛實驗描述於實例18中。該等實驗證明，在高催乳激素血症及正常催乳激素血症雄性及雌性小鼠中，PRLR中和抗體刺激毛髮生長。

本發明抗體解決該問題，從而提供新的用於女性及男性高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少之治療。

因此，本發明之另一態樣在於採用PRLR中和抗體及抗原結合片段來治療或預防高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少。

本發明之另一態樣在於使用本發明所述之抗體及抗原結合片段治療或預防高催乳激素血症性毛髮減少。

組合激素療法

關於仍具有子宮之絕經後女性之熱潮紅治療，使用雌激素(雌二醇或結合馬雌激素=CEE)與助孕素(例如醋酸甲羥助孕酮(MPA)、助孕酮、屈螺酮、左炔諾孕酮)之組合。必須添加助孕素來抑制雌二醇活化之子宮上皮細胞增殖。然而，添加助孕素增加乳腺上皮細胞增殖。因為正常與癌乳腺上皮細胞均對組合雌激素加助孕素治療作出增殖反應，所以發現乳腺癌之相對風險在CEE加MPA治療後增加(JAMA 233:321-333; 2002)。

PRLR中和抗體當每月或隔月投與接受組合激素療法之女性時將抑制增加之乳房上皮細胞增殖。

如實例19中所述，採用先前開發用於定量分析助孕素在子宮及乳房中之作用之小鼠模型(Endocrinology 149:3952-3959, 2008)。切除小鼠之卵巢且在卵巢切除術後14天用媒劑或100 ng雌二醇加100 mg/kg助孕酮模擬激素替代療法治療14天，持續3週。每週用特異性PRLR(10 mg/kg或30 mg/kg)或非特異性抗體(30 mg/kg)治療動物一次。分析PRLR中和抗體對接受組合激素療法之乳房中之增殖活性的作用。

本發明抗體解決該問題以治療在組合激素療法下時所觀測到的增強之乳房上皮細胞增殖。

本發明之另一目標在於在組合激素療法(亦即雌激素+助

孕素療法)中使用PRLR中和抗體及抗原結合片段來抑制乳腺上皮細胞增殖。

本發明之另一態樣在於在組合激素療法(亦即雌激素+助孕素療法)中使用如本發明所述之抗體及抗原結合片段來抑制乳腺上皮細胞增殖。

定義

如本文所使用之標靶抗原人類「PRLR」係指細胞外域與SEQ ID NO. 70之胺基酸位置1至210具有實質上相同之胺基酸序列的人類多肽及其天然存在之對偶基因及/或剪接變異體。如本文所使用之「PRLR之ECD」係指由先前提及之胺基酸表示之PRLR的細胞外部分。另外，標靶人類PRLR亦涵蓋該受體之突變形式，諸如Paul Kelly(Proc Natl Acad Sci U S A.105(38):14533-14538, 2008；及oral communication Turin, 2007)描述之活化突變I146L。

如本文所使用，片語「治療有效量」意欲指當根據所需治療療程投與時，將適於引發所需治療性或預防性作用或反應，包括減輕一些或所有該疾病症狀或減小患該疾病之傾向的治療性或預防性抗體的量。

如本文所使用，因為結合特異性不為絕對的，而具有相對性，所以若抗體能夠區分某一抗原(此處為PRLR)與一或多個參考抗原，則該抗體「特異性結合」係指「特異性針對」或「特異性識別」該抗原。在其最一般形式中(且當未提及指定參考物時)，「特異性結合」係指抗體區分相關抗原與無關抗原之能力，如例如根據一種以下方法所測

定。該等方法包含(但不限於)西方墨點法、ELISA測試、RIA測試、ECL測試、IRMA測試及肽掃描。舉例而言，可進行標準ELISA檢定。可利用標準顯色(例如二次抗體與辣根過氧化物，及四甲基聯苯胺與過氧化氫)進行評分。某些孔中之反應由光密度(例如在450 nm下)評分。典型背景(=陰性反應)可為0.1 OD；典型陽性反應可為1 OD。此意謂陽性/陰性之差異可超過10倍。通常，不是使用單一參考抗原，而是使用約3至5個的一組無關抗原(諸如奶粉、BSA、轉鐵蛋白或其類似物)來進行結合特異性之測定。

然而，「特異性結合」亦可指抗體區分標靶抗原與一或多個用作參考點之密切相關抗原的能力。另外，「特異性結合」可指抗體區分其標靶抗原之不同部分的能力，該等不同部分例如有PRLR之不同域、子域或區，諸如PRLR之ECD之N末端或C末端區中的抗原決定基，或區分PRLR之ECD之一或多個關鍵胺基酸殘基或數段胺基酸殘基的能力。

「親和力」或「結合親和力」 K_D 通常藉由量測平衡締合常數(k_a)及平衡解離常數(k_d)並計算 k_d 比 k_a 之商來確定($K_D=k_d/k_a$)。術語「免疫特異性」或「特異性結合」意謂抗體以低於或等於 $10^{-6}M$ (單價親和力)之親和力 K_D 結合於PRLR或其ECD。術語「高親和力」意謂抗體以低於或等於 $10^{-7}M$ (單價親和力)之親和力 K_D 結合於PRLR或其ECD時的 K_D 。與其他無關分子相比，抗體對標靶抗原可具有實質上較高之親和力。與同源物相比，抗體對標靶抗原亦可具

有實質上較高之親和力，例如針對標靶抗原之相對親和力為至少1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍或更高。該等親和力可使用習知技術容易地測定，諸如藉由平衡透析；藉由使用BIAcore 2000儀器使用由製造商概述之一般程序；藉由使用放射性標記之標靶抗原之放射免疫檢定；或藉由熟習此項技術者已知之另一方法。親和力資料可用例如Scatchard等人，Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949)之方法分析。

如本文所使用，片語「抗體拮抗催乳激素介導之信號傳導」意欲指本發明抗體阻斷催乳激素受體活化，此使得催乳激素受體介導之信號傳導完全受抑制。

如本文所使用，片語「抗體競爭結合」意欲指一抗體與第二抗體或更多抗體之間的競爭結合催乳激素受體。

術語「抗體」以廣義使用，且包括完全裝配之抗體、單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、可結合抗原之抗體片段(Fab'、F'(ab)₂、Fv、單鏈抗體、微型雙功能抗體)、駱駝體(camel body)及包含前述者之重組肽，只要其展現所需生物活性即可。抗體在重鏈上可含有不同恆定域(Fc域)，較佳源自IgG1、IgG2或IgG4同型(參見下文)。可引入修飾效應功能之突變。已鑑別在補體蛋白質C1q與Fc受體之相互作用中起主導作用之Fc域中的胺基酸殘基，且已描述影響效應功能之突變(關於綜述，參見Labrijn等人，Current opinion in Immunology 20:479-485, 2008)。特定言之，IgG1之去糖基化可藉由在胺基酸位置

297處使天冬醯胺突變成丙胺酸或使天冬醯胺突變成麩醯胺酸達成，已報導引廢除抗體衍生之細胞介導之細胞毒性(ADCC)(Sazinsky等人，Proc. Nat. Acad. Sci. 105 (51): 20169, 2008；Simmons等人，J. of Immunological Methods 263: 133-147, 2002)。用丙胺酸置換位置322處之離胺酸可降低ADCC及移除補體衍生之細胞毒性(CDC)，而用丙胺酸同時置換位置234與235處之兩個白胺酸可避免ADCC及CDC[Hezareh等人，J. of Virology, 75 (24):12161-12168, 2001]。為應用IgG4同型作為保留親合力之活體內二價治療劑，可在「核心鉸鏈區」中引入諸如絲胺酸變成脯胺酸之修飾(Schuurman, J.等人，Immunology 97: 693-698, 1999)。人類IgG2分子形成非均質共價二聚物之趨勢可藉由將位置127、232及233處之一個半胱胺酸變成絲胺酸來解決(Allen等人，Biochemistry, 2009, 48 (17), 第3755-3766頁)。效應功能減小之替代格式可為IgG2m4格式，源自含有四個IgG4特異性胺基酸殘基變化之IgG2(An等人，mAbs 1(6), 2009)。抗體片段可由重組DNA技術產生或藉由酶促或化學裂解完整抗體產生，且進一步描述於下文中。單株抗體之非限制性實例包括鼠類、嵌合、人類化、人類及Human Engineered™免疫球蛋白、抗體、具有源自免疫球蛋白之序列之嵌合融合蛋白質或其突變蛋白或衍生物，各進一步描述於下文中。涵蓋完整分子及/或片段(包括化學衍生之抗體)之多聚體或聚集體。

術語「單株抗體」如本文所使用係指自實質上同質性之

抗體群體獲得之抗體，亦即構成群體之個別抗體除可能天然存在之可少量存在之突變外為相同的。單株抗體具有高特異性，針對單個抗原位點。此外，與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體之習知(多株)抗體製劑形成對比，各單株抗體係針對抗原上之單個決定子。除特異性以外，單株抗體之優點亦在於，其由同源培養物合成，未受具有不同特異性及特徵之其他免疫球蛋白污染。

修飾語「單株」指示抗體之特徵為自實質上同質性之抗體群體獲得，且不應解釋為需要由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，欲使用之單株抗體可由首先由Kohler等人，Nature, 256:495, 1975描述之融合瘤方法製造，或可由重組DNA方法(參見例如美國專利第4,816,567號)製造。

「單株抗體」亦可例如為重組、嵌合、人類化、人類、Human Engineered™或抗體片段。

「免疫球蛋白」或「天然抗體」為四聚體醣蛋白。在天然存在免疫球蛋白中，各四聚物由兩對相同多肽鏈構成，各對具有一個「輕」鏈(約25 kDa)及一個「重」鏈(約50-70 kDa)。各鏈之胺基末端部分包括具有約100至110個或110個以上主要負責抗原識別之胺基酸的「可變」區。各鏈之羧基末端部分界定主要負責效應功能之恆定區。視重鏈之恆定域之胺基酸序列而定，免疫球蛋白可歸為不同類別。重鏈分類為 μ 、 δ 、 γ 、 α 及 ϵ ，且分別界定抗體同型為IgM、IgD、IgG、IgA及IgE。若干該等類別可進一步分為亞類或同型，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及

IgA2。不同同型具有不同效應功能；例如IgG1與IgG3同型通常具有ADCC活性。人類輕鏈分類為 κ 及 λ 輕鏈。在輕鏈與重鏈內，可變區與恆定區經具有約12個或12個以上胺基酸之「J」區連接，其中重鏈亦包括具有約10個以上胺基酸之「D」區。一般參見Fundamental Immunology，第7章(Paul, W.編，第2版，Raven Press, N.Y. (1989))。

抗體/免疫球蛋白之「功能片段」或「抗原結合抗體片段」因此定義為保留抗原結合區之抗體/免疫球蛋白之片段(例如IgG之可變區)。抗體之「抗原結合區」通常可見於抗體之一或多個高變區中，亦即CDR-1、CDR-2及/或CDR-3區；然而，可變「構架」區亦可在抗原結合中發揮重要作用，諸如藉由為CDR提供骨架。較佳地，「抗原結合區」包含至少可變輕(VL)鏈之胺基酸殘基4至103及可變重(VH)鏈之胺基酸殘基5至109，更佳VL之胺基酸殘基3至107及VH之胺基酸殘基4至111，且尤其較佳為完全VL及VH鏈[VL之胺基酸位置1至109及VH之1至113，同時胺基酸位置編號根據Kabat資料庫進行((Johnson及Wu, Nucleic Acids Res., 2000, 28, 214-218)]。用於本發明之免疫球蛋白之較佳類別為IgG。

術語「高變」區係指負責抗原結合之抗體或功能片段之可變域VH及VL的胺基酸殘基。高變區包含來自「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基[亦即在輕鏈可變域中為殘基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)及88-97(LCDR3)，且在重鏈可變域中為29-36(HCDR1)、48-66(HCDR2)及

93-102(HCDR3)，如圖12中所述]及/或彼等來自高變環之殘基[亦即在輕鏈可變域中為殘基26-32(LCDR1內)、50-52(LCDR2內)及91-96(LCDR3內)且在重鏈可變域中為26-32(HCDR1內)、53-55(HCDR2內)及96-101(HCDR3內)，如Chothia等人，J. Mol.Biol. 196: 901-917 (1987)所述]。

抗體片段之非限制性實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、域抗體(dAb)、互補決定區(CDR)片段、單鏈抗體(scFv)、單鏈抗體片段、微型雙功能抗體、微型三功能抗體、微型四功能抗體、微抗體、線性抗體(Zapata等人，Protein Eng., 8(10):1057-1062(1995))；螯合重組抗體、三抗體或雙抗體、細胞內抗體、奈米抗體、小模組免疫藥劑(small modular immunopharmaceutical, SMIP)、抗原結合域免疫球蛋白融合蛋白質、駱駝化抗體、含VHH抗體或其突變蛋白或衍生物、及含有免疫球蛋白之足以賦予多肽特異性抗原結合至少一部分(諸如CDR序列)之多肽，只要抗體保留所需生物活性；及由抗體片段形成之多特異性抗體(C. A. K Borrebaeck 編，(1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press；R. Kontermann及S. Duebel編，(2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag)。除「雙特異性」或「雙官能」抗體以外的抗體應理解為其各結合位點相同。F(ab')₂或Fab可經工程改造以使C_{H1}與C_L域之間存在之分子間二硫基相互作用降至最低或完全移除。抗體之木瓜蛋白酶消化產生兩個稱為

「Fab」片段之相同抗原結合片段，各具有單個抗原結合位點；及一殘餘「Fc」片段，其名稱反映其能夠容易地結晶。胃蛋白酶處理產生具有兩個「Fv」片段之F(ab')₂片段。「Fv」片段為含有完全抗原識別且結合位點之最小抗體片段。該區由一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域緊密非共價締合之二聚物構成。在該組態中，各可變域之三個CDR相互作用以在VH-VL二聚物表面上界定抗原結合位點。總體而言，六個CDR賦予該抗體抗原結合特異性。然而，即使單個可變域(或僅包含三個對抗原具有特異性之CDR之一半Fv)亦能夠識別且結合抗原。

「單鏈Fv」或「sFv」或「scFv」抗體片段包含抗體之VH及VL域，其中該等域存在於單多肽鏈中。

Fv多肽較佳另外包含VH域與VL域之間的能夠使Fv形成所需抗原結合結構之多肽連接子。關於sFv之綜述，參見Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab片段與Fab'片段之不同之處在於包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之重鏈CH1域的羧基末端處添加有數個殘基。Fab'-SH在本文中指代恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'。F(ab')₂抗體片段最初呈Fab'片段對產生，在Fab'片段對之間具有鉸鏈半胱胺酸。

「構架」或FR殘基為彼等除高變區殘基以外的可變域殘

基。

片語「恆定區」係指抗體分子之賦予效應功能之部分。

術語「突變蛋白」或「變異體」可互換使用且指在可變區或與可變區等效之部分中含有至少一個胺基酸取代、缺失或插入之抗體多肽序列，其限制條件為突變蛋白或變異體保留所需結合親和力或生物活性。

突變蛋白可與親本抗體實質上同質性或實質上一致。

術語「衍生物」係指利用某些技術共價修飾之抗體，該等技術諸如泛素化、結合於治療劑或診斷劑、標記(例如用放射性核素或各種酶)、共價聚合物連接(諸如聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生))及藉由化學合成非天然胺基酸之插入或取代。

「人類」抗體或功能人類抗體片段因此定義為不嵌合或「人類化」且不來自(全部或部分)非人類物種之抗體。人類抗體或功能抗體片段可源自人類或可為合成人類抗體。

「合成人類抗體」在本文中定義為具有完全或部分自基於已知人類抗體序列之分析之合成序列電子雜交衍生的序列的抗體。人類抗體序列或其片段之電子雜交設計可例如藉由分析人類抗體或抗體片段序列之資料庫並利用由其獲得之資料設計多肽序列來達成。人類抗體或功能抗體片段之另一實例為自具有人類起源之抗體序列之庫(亦即該庫基於取自人類天然來源之抗體)分離的核酸編碼的抗體。人類抗體之實例包括基於n-CoDeR之抗體，如 Carlsson 及 Söderlind Exp. Rev. Mol. Diagn. 1 (1), 102-108 (2001)，

Söderlin等人，Nat. Biotech. 18, 852-856 (2000)及美國專利第6,989,250號所述。

「人類化抗體」或功能人類化抗體在本文中定義為以下者：(i)源自非人類來源(例如攜帶異源免疫系統之轉殖基因小鼠)，該抗體係基於人類生殖系序列；或(ii)CDR移植，其中可變域之CDR來自非人類起源，而可變域之一或多個構架具有人類起源且恆定域(若存在)具有人類起源。

片語「嵌合抗體」如本文所使用係指含有源自兩個通常起源於不同物種之不同抗體(參見例如美國專利第4,816,567號)之序列的抗體。最通常，嵌合抗體包含人類及鼠類抗體片段，一般為人類恆定區及小鼠可變區。

「Human Engineered™」抗體藉由根據Studnicka等人，美國專利第5,766,886號中所述之方法改變親本序列產生，諸如由SEQ ID NO 58、61、64、67表示之抗體，且描述於專利申請案WO 08/022295中。

本發明抗體可源自重組抗體基因庫。製備重組人類抗體基因譜系之技術之發展及編碼抗體片段於絲狀噬菌體表面上之呈現提供直接製備及選擇人類抗體之重組方法，該方法亦可應用於人類化、嵌合、鼠類或突變蛋白抗體。由噬菌體技術產生之抗體以抗原結合片段(通常Fv或Fab片段)形式在細菌中產生，且因此缺乏效應功能。效應功能可利用以下兩種策略中之一種引入：可將該等片段工程改造成完全抗體以於哺乳動物細胞中表現，或工程改造成含能夠觸發效應功能之第二結合位點的雙特異性抗體片段。抗體

之Fd片段(VH-CH1)及輕鏈(VL-CL)通常由PCR分開選殖，且隨機重組於組合噬菌體呈現庫中，隨後可就與特定抗原之結合加以選擇。Fab片段表現於噬菌體表面上，亦即物理連接於編碼該等Fab片段之基因。因此，由抗原結合選擇Fab共選擇接著可擴增之Fab編碼序列。經若干輪抗原結合及再擴增，一種稱為淘選之程序，富集對抗原具有特異性之Fab並最後分離。

關於自噬菌體呈現庫衍生人類抗體已描述多種程序。該等庫可基於單一母體構架，在該構架中允許多樣性活體內形成（亦即人類衍生）之CDR重組，如由Carlsson及Söderlind Exp. Rev. Mol. Diagn. 1 (1), 102-108 (2001)，Söderlin等人，Nat. Biotech. 18, 852-856 (2000)及美國專利第6,989,250號所述。或者，該抗體庫可基於經電子雜交設計且由合成產生之核酸編碼的胺基酸序列。抗體序列之電子雜交設計係例如藉由分析人類序列之資料庫並利用由其獲得之資料設計多肽序列來達成。設計及獲得電子雜交產生之序列的方法描述於例如Knappik等人，J. Mol. Biol. (2000) 296:57；Krebs等人，J. Immunol. Methods. (2001) 254:67；及美國專利第6,300,064號中。關於噬菌體呈現技術之綜述，參見WO 08/022295(Novartis)。

或者，本發明抗體可來自動物。該抗體可經人類化或經人類化工程改造，概述於WO 08/022295(Novartis)中；該抗體可來自轉殖基因動物[亦參見WO 08/022295(Novartis)]。

如本文所使用，抗原(例如PRLR)之不同「形式」因此定義為由不同轉譯及轉譯後修飾產生之不同蛋白質分子，諸如(但不限於)一次催乳激素受體轉錄物之剪接差異、糖基化差異及轉譯後蛋白水解裂解差異。

如本文所使用，術語「抗原決定基」包括能夠特異性結合免疫球蛋白或T細胞受體之任何蛋白質決定子。抗原決定基決定子通常由分子之化學活性表面組(諸如胺基酸或糖側鏈)組成，且通常具有特異性三維結構特徵以及荷質比特徵。若按照熟習此項技術者熟知之任何方法，在競爭性結合檢定中，一個抗體展示與第二抗體競爭，且較佳若抗原決定基之所有胺基酸由兩個抗體結合，則認為該兩個抗體「結合相同抗原決定基」。

術語「成熟抗體」或「成熟抗原結合片段」，諸如成熟Fab變異體，包括展現更強地結合(亦即以增加之親和力結合)既定抗原(諸如PRLR之細胞外域)的抗體或抗體片段之衍生物。成熟為鑑別抗體或抗體片段之六個CDR內少數引起該親和力增加之突變的方法。成熟方法為在抗體中引入突變之分子生物學方法與鑑別改良之結合劑之篩選的組合。

治療方法

治療方法涉及投與需要治療之個體治療有效量之本發明涵蓋之抗體。因此，「治療有效」量定義為抗體依單次劑量或根據多次劑量方案單獨或與其他藥劑組合，足以阻斷個體經處理區域之PRLR陽性細胞增殖，減輕不良病狀時

之用量，且該量為毒理學所容許。個體可為人類或非人類動物(例如兔子、大鼠、小鼠、猴或其他較低等靈長類動物)。

本發明抗體可與已知藥劑共投與，且在一些情況下，抗體本身可經修飾。舉例而言，抗體可與免疫毒素或放射性同位素結合以潛在地進一步增加功效。

本發明抗體可在PRLR有不當高度表現之多種情形下用作治療或診斷工具。尤其適於用本發明抗體處理之病症及狀況為子宮內膜異位症、子宮腺肌症、雌性非激素性避孕、良性乳房疾病及乳腺痛、泌乳抑制、良性前列腺增生、類纖維瘤、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少；及在組合激素療法中用以抑制乳腺上皮細胞增殖之聯合治療。

為了治療任何上述病症，根據本發明使用之醫藥組合物可依習知方式使用一或多種生理學上可接受之載劑或賦形劑調配。本發明抗體可經任何適合的方式投與，該等方式可視所治療之病症類型而變化。可能的投藥途徑包括非經腸(例如肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下)、肺內及鼻內，及必要時用於局部免疫抑制治療、器官內投藥。另外，本發明抗體可經脈衝式輸注，例如投與遞減劑量之抗體。部分視投藥為短暫還是長期而定，給藥較佳經注射給予，最佳經靜脈內或皮下注射給予。投藥量將視多種因素而定，諸如臨床症狀、個體體重、是否投與其他藥物。熟習此項技術者應認識到，投藥途徑將視所治療之病症或

病狀而變化。

確定本發明之新穎多肽之治療有效量基本上將視特定患者特徵、投藥途徑及所治療之病症性質而定。一般指南可見於例如人用藥品註冊技術要求國際協調會(International Conference on Harmonisation)之出版物及 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES，第27及28章，第484-528頁(第18版，Alfonso R. Gennaro編，Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990)。更特定言之，確定治療有效量將視諸如藥劑之毒性及功效之因素而定。毒性可使用此項技術熟知之方法測定且可見於上述參考文獻中。功效可利用相同指南結合下文實例中所述之方法測定。

醫藥組合物及投藥

本發明亦係關於醫藥組合物，其可包含PRLR抗體，且可單獨使用或與至少一種其他藥劑(諸如穩定化合物)組合使用，其可於任何無菌的生物相容醫藥載劑(包括但不限於生理鹽水、緩衝生理鹽水、右旋糖及水)中投與。任何該等分子均可單獨或與其他藥劑、藥物或激素組合以該等分子與賦形劑或醫藥學上可接受之載劑混合之醫藥組合物投與患者。在本發明之一實施例中，醫藥學上可接受之載劑為醫藥學惰性的。

本發明亦係關於醫藥組合物之投藥。該投藥係非經腸達成。非經腸傳遞方法包括局部、動脈內(直接傳遞至腫瘤)、肌肉內、皮下、髓內、鞘內、心室內、靜脈內、腹膜內、子宮內或鼻內投藥。除活性成分以外，該等醫藥組

合物亦可含有適合的醫藥學上可接受之載劑，包含賦形劑及有利於活性化合物加工成醫藥學上可用之製劑的助劑。關於調配及投藥技術之更多細節可見於 Remington's Pharmaceutical Sciences(Maack Publishing Co編，Easton, Pa.)之最新版本。

用於非經腸投藥之醫藥調配物包括活性化合物水性溶液。對於注射，本發明醫藥組合物可在水性溶液、較佳諸如漢克氏溶液(Hanks's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理學上緩衝生理鹽水等生理學相容的緩衝液中調配。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨醇或葡聚糖。另外，活性化合物之懸浮液可酌情製備成油性注射懸浮液。適合的親脂性溶劑或媒劑包括諸如芝麻油之脂肪油，或諸如油酸乙酯或甘油三酯之合成脂肪酸酯，或脂質體。懸浮液亦可視情況含有適合的穩定劑或增加化合物溶解性以允許製備高濃溶液之試劑。

對於局部或鼻用投藥，調配物中使用適於滲透特定障壁之滲透劑。該等滲透劑一般在此項技術中為已知的。

非經腸投藥亦包含非經腸傳遞方法，該等方法亦包括動脈內、肌肉內、皮下、髓內、鞘內及心室內、靜脈內、腹膜內、子宮內、陰道或鼻內投藥。

套組

本發明進一步係關於醫藥包裝及套組，其包含一或多個填充有先前提及之本發明組合物之一或多個成分的容器。

該(該等)容器可隨附呈由管理醫藥或生物產品之製造、使用或銷售之政府機構規定的形式的告示，該告示反映該機構批准該產品之製造、使用或銷售可用於人類投藥。

在另一實施例中，該等套組可含有編碼本發明抗體之DNA序列。編碼該等抗體之DNA序列較佳提供於適於轉染至宿主細胞中及由宿主細胞表現之質體中。質體可含有啟動子(通常為誘導性啟動子)以調控DNA於宿主細胞中之表現。質體亦可含有適當的限制位點以有利於其他DNA序列插入質體中，產生各種抗體。質體亦可含有眾多其他元件以有利於所編碼之蛋白質之選殖及表現。該等元件為熟習此項技術者所熟知，且包括例如可選擇標記物、起始密碼子、終止密碼子及其類似物。

製造及儲存

本發明醫藥組合物可以此項技術中已知之方式製造，例如藉助於常規混合、溶解、造粒、製糖衣藥丸、細磨、乳化、囊封、包埋或凍乾方法。

醫藥組合物可以在使用之前與緩衝液組合的於1 mM-50 mM組胺酸、0.1%-2%蔗糖、2%-7%甘露醇(pH值範圍為4.5至5.5)中之凍乾粉末形式提供。

在製備包含本發明化合物調配於可接受之載劑中的醫藥組合物之後，可將其置放於適當的容器中且貼上標籤以說明用於治療某一適應病狀。對於PRLR抗體投藥，該標籤應包括投藥之量、頻率及方法。

治療有效劑量

適合用於本發明之醫藥組合物包括含有有效量之活性成分而可達成預定目的(亦即治療特徵在於PRLR表現之特定疾病狀態)之組合物。有效劑量的確定係完全在熟習此項技術者之能力範圍內。

對於任何化合物，治療有效劑量最初可在細胞培養檢定(例如淋巴瘤細胞)或動物模型(通常為小鼠、大鼠、兔子、狗、豬或猴)中評估。動物模型亦用於達成所需之濃度範圍及投藥途徑。隨後可使用該等資訊來確定適用於人類之劑量及投藥途徑。

治療有效劑量係指改善症狀或病狀之蛋白質或其抗體、拮抗劑或抑制劑之量。該等化合物之治療功效及毒性可藉由標準醫藥程序在細胞培養物或實驗動物中測定，例如ED₅₀(在50%群體中治療有效之劑量)及LD₅₀(使50%群體致命之劑量)。治療效應與毒性效應之間的劑量比為治療指數，且可以比率ED₅₀/LD₅₀表示。展現高治療指數之醫藥組合物較佳。使用自細胞培養檢定及動物研究獲得之資料來確定可供人類使用之劑量範圍。該等化合物之劑量較佳處於包括ED₅₀的極小或不具有毒性之循環濃度範圍內。劑量可視所採用之劑型、患者之敏感性及投藥途徑而定在該範圍內變化。

確切劑量可由個別醫師考慮所治療之患者加以選擇。調整劑量及投藥以提供足量活性部分或維持所需作用。可考慮之其他因素包括疾病狀態之嚴重程度，例如子宮內膜異位病灶之尺寸及位置；患者之年齡、體重及性別；膳食、

投藥時間及頻率、藥物組合、反應敏感性、及對療法之耐受性/反應。視特定調配物之半衰期及清除率而定，長效醫藥組合物可每3至4天投與、每週投與、或每兩週投與一次、或一個月內投與一次。

視投藥途徑而定，正常劑量可為0.1至100,000微克不等，總劑量至多約2 g。關於特定劑量及傳遞方法之指南提供於文獻中。參見US. 4,657,760；US 5,206,344；或US 5,225,212。對於聚核苷酸，熟習此項技術者應採用不同於用於蛋白質或其抑制劑之調配物。類似地，聚核苷酸或多肽之傳遞應對特定細胞、狀況、位置等具有特異性。放射性標記之抗體之較佳比活性可在每毫克蛋白質0.1至10 mCi範圍內(Riva等人，Clin. Cancer Res. 5:3275s-3280s, 1999；Wong等人，Clin. Cancer Res. 6:3855-3863, 2000；Wagner等人，J. Nuclear Med. 43:267-272, 2002)。

進一步藉由以下實例來描述本發明。該等實例之提供僅旨在參考具體實施例來說明本發明。雖然該等例證說明本發明之某些具體態樣，但其不描寫侷限性或限定本發明之範疇。

除非另有詳細描述，否則所有實例均使用對熟習此項技術者而言為熟知且常規之標準技術進行。以下實例之常規分子生物學技術可如標準實驗室手冊(諸如Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版；Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)所述進行。

Seq ID NO:1表示HCDR1, 006-H08之胺基酸序列
Seq ID NO:2表示HCDR1, 002-H06之胺基酸序列
Seq ID NO:3表示HCDR1, 002-H08之胺基酸序列
Seq ID NO:4表示HCDR1, 006-H07之胺基酸序列
Seq ID NO:5表示HCDR1, 001-E06之胺基酸序列
Seq ID NO:6表示HCDR1, 005-C04之胺基酸序列
Seq ID NO:7表示HCDR2, 006-H08之胺基酸序列
Seq ID NO:8表示HCDR2, 002-H06之胺基酸序列
Seq ID NO:9表示HCDR2, 002-H08之胺基酸序列
Seq ID NO:10表示HCDR2, 006-H07之胺基酸序列
Seq ID NO:11表示HCDR2, 001-E06之胺基酸序列
Seq ID NO:12表示HCDR2, 005-C04之胺基酸序列
Seq ID NO:13表示HCDR3, 006-H08, 002-H06之胺基酸序列
Seq ID NO:14表示HCDR3, 002-H08之胺基酸序列
Seq ID NO:15表示HCDR3, 006-H07之胺基酸序列
Seq ID NO:16表示HCDR3, 001-E06之胺基酸序列
Seq ID NO:17表示HCDR3, 005-C04之胺基酸序列
Seq ID NO:18表示LCDR1, 006-H08之胺基酸序列
Seq ID NO:19表示LCDR1, 002-H06之胺基酸序列
Seq ID NO:20表示LCDR1, 002-H08之胺基酸序列
Seq ID NO:21表示LCDR1, 006-H07之胺基酸序列
Seq ID NO:22表示LCDR1, 001-E06之胺基酸序列
Seq ID NO:23表示LCDR1, 005-C04之胺基酸序列
Seq ID NO:24表示LCDR2, 006-H08, 002-H08之胺基酸序列

Seq ID NO:25 表示 LCDR2, 002-H06 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:26 表示 LCDR2, 006-H07 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:27 表示 LCDR2, 001-E06 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:28 表示 LCDR2, 005-C04 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:29 表示 LCDR3, 006-H08 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:30 表示 LCDR3, 002-H06, 001-E06 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:31 表示 LCDR3, 002-H08 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:32 表示 LCDR3, 006-H07 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:33 表示 LCDR3, 005-C04 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:34 表示 VH, 006-H08 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:35 表示 VH, 002-H06 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:36 表示 VH, 002-H08 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:37 表示 VH, 006-H07 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:38 表示 VH, 001-E06 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:39 表示 VH, 005-C04 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:40 表示 VL, 006-H08 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:41 表示 VL, 002-H06 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:42 表示 VL, 002-H08 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:43 表示 VL, 006-H07 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:44 表示 VL, 001-E06 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:45 表示 VL, 005-C04 之 胺 基 酸 序 列
Seq ID NO:46 表示 VH, 006-H08 之 核 酸 序 列
Seq ID NO:47 表示 VH, 002-H06 之 核 酸 序 列
Seq ID NO:48 表示 VH, 002-H08 之 核 酸 序 列

Seq ID NO:49表示 VH, 006-H07之核酸序列

Seq ID NO:50表示 VH, 001-E06之核酸序列

Seq ID NO:51表示 VH, 005-C04之核酸序列

Seq ID NO:52表示 VL, 006-H08之核酸序列

Seq ID NO:53表示 VL, 002-H06之核酸序列

Seq ID NO:54表示 VL, 002-H08之核酸序列

Seq ID NO:55表示 VL, 006-H07之核酸序列

Seq ID NO:56表示 VL, 001-E06之核酸序列

Seq ID NO:57表示 VL, 005-C04之核酸序列

Seq ID NO:58表示 VH, HE06642, Novartis(WO 2008/22295)
之胺基酸序列

Seq ID NO:59表示 VH, XHA06642, Novartis(WO 2008/22295)
之胺基酸序列

Seq ID NO:60表示 VH, XHA06983, Novartis(WO 2008/22295)
之胺基酸序列

Seq ID NO:61表示 VL, HE06642之胺基酸序列

Seq ID NO:62表示 VL, XHA06642 Novartis(WO 2008/22295)
之胺基酸序列

Seq ID NO:63表示 VL, XHA06983 Novartis(WO 2008/22295)
之胺基酸序列

Seq ID NO:64表示 VH, HE06642之核酸序列

Seq ID NO:65表示 VH, XHA06642 Novartis(WO 2008/22295)
之核酸序列

Seq ID NO:66表示 VH, XHA06983 Novartis(WO 2008/22295)

之核酸序列

Seq ID NO:67表示VL, HE06642之核酸序列

Seq ID NO:68表示VL, XHA06642, Novartis(WO 2008/22295)
之核酸序列

Seq ID NO:69表示VL, XHA06983, Novartis(WO 2008/22295)
之核酸序列

Seq ID NO:70表示人類ECD_PRLR, 胺基酸位置1-210, S1
域1-100(S1域構築體1-102), S2域101-210

Seq ID NO:71表示CDS人類ECD_PRLR, 核苷酸位置1-630

Seq ID NO:72表示鼠類ECD_PRLR, 胺基酸位置1-210

Seq ID NO:73表示CDS鼠類ECD_PRLR, 核苷酸位置1-630

【實施方式】

實例

實例1

自人類抗體噬菌體呈現庫分離標靶特異性抗體

為了分離一組能夠中和人類PRLR活性之抗體, 並行研究三個表現Fab及scFv片段之人類抗體噬菌體呈現庫。用於庫淘選之標靶為如上文在WO 08/022295(Novartis)中所述製備之催乳激素受體之可溶性細胞外域(ECD)(人類催乳激素受體胺基酸25-234)。替代性標靶為經由胺基酸序列為「異白胺酸-麩胺酸-甘胺酸-精胺酸-甲硫胺酸-天冬胺酸酯」之連接子在C末端上連接於6個組胺酸或人類IgG1-Fc域的PRLR之ECD。

根據Marks等人(Methods Mol Biol. 248:161-76, 2004)描

述之方法自噬菌體呈現中選擇標靶特異性抗體。簡言之，在室溫下與50 pmol經生物素標記之ECD一起培育噬菌體呈現庫1小時，且隨後使用100 μ l 抗生蛋白鏈菌素珠粒懸浮液(Dynabeads® M-280抗生蛋白鏈菌素，Invitrogen)捕捉所形成之複合物。藉由用洗滌緩衝液(PBS+5%乳汁)洗滌珠粒來移除非特異性噬菌體。用0.5 ml 100 nM三乙胺(TEA)溶離結合之噬菌體，且藉由添加等體積之IM TRIS-Cl(pH 7.4)立即中和。使用溶離之噬菌體池感染對數期生長的TG1大腸桿菌細胞，且如Methods Mol Biol. 248:161-76, 2004所述救援噬菌粒。重複選擇，總計三輪。在ELISA檢定中，就結合活性篩選自來自第三輪淘選之感染溶離之噬菌體的TG1細胞獲得之單一菌落。簡言之，在96孔板中，使用自感染溶離之噬菌體之TG1細胞獲得的單一菌落接種培養基。

在振盪式恆溫箱中在30°C下培養隔夜後，使微量培養物生長至OD₆₀₀=0.6，此時藉由添加1 mM IPTG誘導可溶性抗體片段之表現。短暫離心細菌，且製備周質提取物並根據由微板製造商提供之標準ELISA方案用於偵測抗體與固定於96孔微板(96孔平底免疫吸附板，Nunc)上之ECD的結合活性。

使用Biacore® 2000估算抗催乳激素受體(PRLR)抗體結合於重組細胞外域(ECD)之親和力，且將其用於抗體之親和力分等級。

實例2

藉由即時TaqMan PCR分析定量分析患者及健康對照組之正常子宮內膜及異位子宮內膜及子宮內膜異位病灶中的催乳激素及催乳激素受體基因表現

使用ABI Prism 7700序列偵測器系統根據製造商之說明書 (PE Applied Biosystems)，且如 Endocrinolgy 2008, 149(8): 3952-3959中所述及如此項領域中之專家所知，進行即時Taqman PCR分析。相對於親環素(cyclophyllin)之表現校正PRL及PRLR之相對表現量。吾人藉由使用定量即時Taqman PCR分析分析PRL及PRLR在健康女性之子宮內膜中及在患者之子宮內膜及子宮內膜異位病灶中之表現。與健康子宮內膜或獲自患者之子宮內膜相比，催乳激素及其受體之表現在子宮內膜異位病灶中明顯上調。

結果展示於圖1及2中。

該等研究結果暗示自分泌催乳激素信號傳導在子宮內膜異位症及子宮腺肌症(子宮內子宮內膜異位，一種侷限於子宮之內膜異位症的形式)之發展及維持中起作用。

實例3

藉由北方墨點法分析人類組織中之催乳激素受體表現

自不同大鼠組織分離RNA並在凝膠電泳後轉移至尼龍膜。使膜與大鼠催乳激素受體或 β -肌動蛋白(作為內參考物)之放射性標記之cDNA連續雜交，洗滌且暴露於膜。該等帶對應於大鼠催乳激素受體及 β -肌動蛋白之mRNA。圖3中所示之結果指示催乳激素受體在胎盤、前列腺、卵巢及腎上腺中有強表現。

實例 4

調控大鼠前列腺中之催乳激素受體蛋白質表現-閹割及激素治療之影響

閹割大鼠或使其保持完整。用媒劑(完整)、DHT(3 mg/kg)或E2(0.4 mg/kg)每日處理完整動物，持續14天。此後，自所有處理組之動物分離前列腺，且製備蛋白質提取物。藉由凝膠電泳分離蛋白質提取物並轉移至膜。使用市售抗體MA610(Santa Cruz Biotechnology)偵測催乳激素受體。結果展示於圖4中，且指示大鼠前列腺中催乳激素受體之激素調控。

實例 5

催乳激素受體中和抗體及非特異性對照抗體對催乳激素誘導之BaF3細胞(經人類催乳激素受體穩定轉染)之增殖的抑制

為了分析PRLR中和抗體之活體外功效，使用對催乳激素活化之BaF3細胞之細胞增殖的抑制。用人類PRLR穩定轉染細胞，且按常規在含有2 mM麩醯胺酸之RPMI中在10% FCS及10 ng/ml人類催乳激素存在下培養。在含有1% FCS之無催乳激素培養基中挨餓6小時後，將細胞接種於96孔板中，密度為每孔10000個細胞。用20 ng/ml催乳激素刺激細胞，且與遞增劑量之PRLR中和抗體一起共培育兩天。使用CellTiter-Glo發光細胞活力檢定(Promega)分析細胞增殖。產生對催乳激素刺激之細胞生長之抑制的劑量反應曲線，且計算IC₅₀值。作為陰性對照組，使用以非特異

性對照抗體刺激。

劑量反應曲線及 IC_{50} 值展示於圖5中。非特異性抗體不抑制穩定表現人類PRLR之BaF細胞增殖，而特異性抗體阻斷細胞增殖且展現不同效能。中和抗體006-H08在該讀數範例中顯示最高效能。

實例6

特異性及非特異性抗體對催乳激素誘導之大鼠淋巴瘤細胞增殖的抑制

亦使用對催乳激素依賴性大鼠淋巴瘤細胞(Nb2-11細胞)增殖的抑制來測試PRLR中和抗體之活體外功效。按常規使Nb2-11細胞在含10% FCS及10%馬血清之RPMI中生長。在開始細胞生長檢定之前，使細胞在以1% FCS代替10% FCS之相同培養基中生長24小時。以後，將細胞接種於96孔板中之無FCS之培養基中，密度為每孔10000個細胞。在有或無遞增劑量之PRLR中和抗體或對照抗體存在下，用10 ng/ml人類催乳激素刺激細胞2天。以後，使用CellTiter-Glo發光細胞活力檢定(Promega)評定細胞增殖。劑量反應曲線及 IC_{50} 值展示於圖6中。非特異性抗體及不結合大鼠PRLR之抗體XHA06.983不阻斷Nb2-11細胞增殖。結合大鼠PRLR之XHA06.642阻斷Nb2-11細胞增殖。

實例7

催乳激素受體中和抗體對T47D細胞中之催乳激素誘導之STAT5磷酸化的抑制

為了分析PRLR中和抗體在另一讀數中之活體外功效，

使用對經催乳激素處理之人類T47D細胞中之STAT5磷酸化的抑制。使T47D細胞在含有10% FCS及2 mM麩醯胺酸之RPMI中生長。將細胞接種於24孔板中，密度為每孔 0.5×10^5 個細胞。第二天，使細胞在無血清之RPMI中挨餓1小時。此後，在無或有20 ng/ml人類催乳激素存在下，在有或無不同劑量之PRLR中和抗體或非特異性對照抗體下，培育細胞30分鐘。此後，清洗細胞並在70 μ l溶解緩衝液中溶解。離心溶解產物，且在-80°C下冷凍上清液。使用西方墨點法分析提取物(抗pSTAT5A/B抗體，來自upstate 07-586，按1:1000稀釋)。作為內參考物，與抗 β 微管蛋白抗體(ab7287，按1:500稀釋)一起培育剝離之墨點。

結果展示於圖7中。除非特異性FITC抗體外，所有PRLR中和抗體均劑量依賴性地阻斷人類T47D細胞中之STAT5磷酸化。所有測試抗體均以高親和力結合於人類PRLR。

實例8

對經人類PRLR穩定轉染之Hek293細胞中之螢光素酶報導體基因活性的抑制-分析催乳激素受體中和抗體及非特異性對照抗體

為了進一步分析PRLR中和抗體之活體外功效，使用報導體基因檢定。在LHRE(催乳激素反應元件)控制下，用螢光素酶報導體基因短暫轉染經人類PRLR穩定轉染之HEK293細胞7小時。此後，將細胞接種於96孔板中，密度為每孔20000個細胞(0.5%木炭剝離血清(charcoal stripped serum)，DMEM)。第二天，添加300 ng/ml人類催乳激素，

加上及不加上遞增劑量之PRLR中和抗體或對照抗體。24小時後，測定螢光素酶活性。結果展示於圖8中。與非特異性抗體形成對比，006-H08及HE06.642在經人類PRLR穩定轉染之HEK293細胞中抑制螢光素酶活性。

實例9

對經鼠類PRLR穩定轉染之Hek293細胞中之螢光素酶報導體基因活性的抑制-分析催乳激素受體中和抗體及非特異性對照抗體

為了進一步分析PRLR中和抗體對鼠類催乳激素受體之活體外功效，使用報導體基因檢定。在LHRE(催乳激素反應元件)控制下，用螢光素酶報導體基因短暫轉染經鼠類PRLR穩定轉染之HEK293細胞7小時。此後，將細胞接種於96孔板中，密度為每孔20000個細胞(0.5%木炭剝離血清，DMEM)。第二天，添加200 ng/ml人類催乳激素，加上及不加上遞增劑量之PRLR中和抗體或對照抗體。24小時後，測定螢光素酶活性。結果展示於圖9中。而抗體005-C04(實心三角形)展現高活性(IC_{50} 值=3 nM)，抗體HE06.642(實心圓形)不顯示高達330 nM之活性。非特異性對照抗體(空心圓形)為完全非活性的。與Novartis抗體HE06.642形成對比，抗體005-C04能夠阻斷鼠類PRLR介導之信號傳導。

實例10

催乳激素受體中和抗體及非特異性對照抗體對催乳激素誘導之BaF3細胞(經鼠類催乳激素受體穩定轉染)之增殖

的抑制

採用對催乳激素所活化Ba/F3細胞之細胞增殖的抑制作用分析PRLR中和抗體之活體外功效。用鼠類PRLR穩定轉染細胞，且按常規在含有2 mM麩醯胺酸之RPMI中在10% FCS及10 ng/ml人類催乳激素存在下培養。在含有1% FCS之無催乳激素培養基中挨餓6小時後，將細胞以每孔10000個細胞之密度接種於96孔板中。用40 ng/ml催乳激素刺激細胞，且與遞增劑量之PRLR中和抗體一起共培育兩天。使用CellTiter-Glo發光細胞活力檢定(Promega)分析細胞增殖。產生對催乳激素刺激之細胞生長之抑制的劑量反應曲線，且計算IC₅₀值。作為陰性對照組，使用以非特異性對照抗體刺激。

劑量反應曲線及IC₅₀值展示於圖10中。非特異性對照抗體(實心正方形)對鼠類PRLR為非活性的。抗體HE06.642、001-E06及001_D07僅有限抑制鼠類PRLR活化。僅抗體005-C04完全阻斷鼠類PRLR活化。

實例11

催乳激素受體中和抗體IgG1 005-C04在小鼠中之避孕作用

為了測試催乳激素受體中和抗體對小鼠生育力的影響，使12週大的雌性與雄性NMRI小鼠交配7天(第0天-第7天)。在第-3天、第0天、第3天及第6天藉由腹膜內注射磷酸鹽緩衝生理食鹽水、溶解於磷酸鹽緩衝生理鹽水中之非特異性IgG1對照抗體(抗FITC，10 mg/kg)或濃度為每公斤體重10 mg或30 mg之IgG1中和抗體005-C04(=IgG1 005-C04)來

處理雌性小鼠。各實驗組使用10隻雌性動物。使各隻雄性與兩隻雌性交配，一隻雌性來自經磷酸鹽緩衝生理食鹽水或非特異性抗體處理之陰性對照組，另一隻雌性經特異性中和抗體處理。不會使至少一隻雌性受孕之雄性之交配數據將會從分析中排除。讀數參數為平均窩仔數及受孕率(以%計量)，後者以每實驗組之窩數除以該組內理論上可能的窩數而計算。結果展示於圖11中。

圖11A展示所獲得之受孕率。受孕率如下：

經磷酸鹽緩衝生理鹽水處理之小鼠組為87.5%，

經非特異性對照抗體(10 mg/kg)處理之小鼠組為75%，

經PRLR中和抗體IgG1 005-C04(10 mg/kg)處理之小鼠組為100%，及

經PRLR中和抗體IgG1 005-C04(30 mg/kg)處理之小鼠組為0%。

圖11B展示對不同實驗組所觀察到之窩仔數。窩仔數如下：

- 經磷酸鹽緩衝生理鹽水處理之小鼠組每窩10.9隻小鼠，
- 經非特異性對照抗體(10 mg/kg)處理之小鼠組每窩12.3隻小鼠，
- 經PRLR中和抗體IgG1 005-C04(10 mg/kg)處理之小鼠組每窩13隻小鼠，及
- 經PRLR中和抗體IgG1 005-C04(30 mg/kg)處理之小鼠組每窩0隻小鼠。

該交配研究之結果證明，催乳激素受體中和抗體IgG1 005-C04在每公斤體重30 mg下測試時完全阻止小鼠妊娠。

實例12

抗原決定基分組

使用 Biacore 藉由監測數對抗 PRLR 抗體與 ECD-PRLR(SEQ ID NO: 70)之同時結合進行抗原決定基分組實驗。簡言之，使用正羥基丁二醯胺(NHC)與N-乙基-N'-二甲基胺基丙基碳化二亞胺(EDC)經由一級胺偶合將第一抗體共價固定於感測器晶片上。隨後用乙醇醯胺阻斷表面上未佔據之結合位點。可溶性ECD-PRLR(SEQ ID NO: 70)經由固定之抗體捕捉於表面上，因此，捕捉抗體之抗原決定基因所有結合之ECD-PRLR分子而受阻斷。立即使第二抗體通過該表面以結合於固定之ECD-PRLR。識別相同或重疊抗原決定基之兩個抗體不能結合於ECD-PRLR，而具有獨特抗原決定基之抗體則能夠結合。用甘胺酸(pH 2.8)使抗體表面再生以移除結合之蛋白質，隨後用其他抗體重複該過程。測試抗體之所有組合。代表性結果展示於表7中。抗體 006-H08、002-H06、002-H08、006-H07 及 XHA06983彼此競爭性結合於ECD-PRLR，表明其靶向重疊的抗原決定基(抗原決定基組1，表6)。另外，該等抗體競爭性結合於PRL，001-E06之情況亦如此(抗原決定基組2，表6)。該抗體靶向ECD-PRLR之與先前提及之位點不同的位點。最後，抗體 005-C04競爭性結合於HE06.642及 XHA06.642，且不與PRL競爭(抗原決定基組3，表6)。

表 7：靶向人類催乳激素受體(PRLR)之細胞外域(ECD)上之重疊抗原決定基的抗體組

抗體	抗原決定基組	與催乳激素競爭
006-H08	1	是
002-H06	1	是
002-H08	1	是
006-H07	1	是
001-E06	2	是
005-C04	3	否
HE06.642	3	否
XHA06.642	3	否
XHA06.983	1	是

實例 13

抗體對表現於細胞表面上之小鼠及人類 PRLR 之交叉反應性

為了測定抗 PRLR 抗體對表現於細胞上之小鼠及人類 PRLR 之結合特徵，利用流式細胞術對分別穩定表現人類及鼠類 PRLR 之 HEK293 細胞測試結合。收集該等細胞以及無 PRLR 之親本 HEK293 細胞株，離心，且再懸浮於含有 2% FBS 及 0.1% 疊氮化鈉之 1×PBS(FACS 緩衝液)中，每毫升約 5×10^6 個細胞。以 FACS 緩衝液稀釋抗體 005-C04、001-E06 及 HE06.642 至 2 倍最終濃度，且添加至適當樣品孔(每孔 50 μ l)中。對於二次抗體及自發螢光對照物，向適當孔中添加 50 μ l FACS 緩衝液。向各樣品孔中添加 50 μ l 細胞懸浮液。在 4°C 下培育樣品 1 小時，用冷 FACS 緩衝液洗滌兩次，且再懸浮於按 1:100 稀釋之含有 PE 結合山羊抗人類 IgG 之

FACS緩衝液中。在4℃下培育30分鐘後，用冷FACS緩衝液洗滌細胞兩次，再懸浮於含有1 mg/ml碘化丙錠 (Invitrogen, San Diego, CA)之FACS緩衝液中並利用流式細胞術分析。如圖13中所示，抗體005-C04及001-E06結合於該等細胞上之人類及鼠類PRLR，而HE06.642僅結合於人類PRLR。該觀測結果與實例9中所報導之關於HE06.642在鼠類PRLR依賴性螢光素酶報導體基因檢定中之功效缺失的研究結果一致。雖然005-C04及HE06.642競爭性結合於人類PRLR，但該兩種抗體相對於鼠類PRLR之不同結合性質表明其抗原決定基特異性有差異。

實例14

Fab及scFv抗體對細胞信號傳導級聯之抑制活性

為了在功能上表徵Fab及scFv篩選命中項針對PRLR觸發之信號傳導級聯的活性，量測對PRLR本身及經催乳激素處理之人類T47D細胞中的轉錄調控物ERK1/2及STAT5上之磷酸化的抑制。使T47D細胞在含有2 mM L-麩醯胺酸、10%木炭剝離之FBS及胰島素-轉鐵蛋白-硒-A(Gibco)之RPMI中生長。將細胞接種於6孔板或96孔板中，密度為每孔 1.5×10^6 個細胞。第二天，更換生長培養基。第三天，使細胞在無血清RPMI中挨餓1小時。此後，在有或無不同劑量之PRLR中和抗體或非特異性對照抗體下，在500 ng/ml人類催乳激素存在下，培育細胞5分鐘。此後，清洗細胞且在溶解緩衝液中溶解。離心溶解產物且在-80℃下冷凍上清液。根據用於量測PRLR磷酸化之DuoSet IC「人類磷

酸基-催乳激素R」套組(R&D Systems)、根據用於量測STAT5磷酸化之PathScan磷酸基-STAT5(Tyr694)夾心ELISA套組(Cell Signaling Technology；#7113)及根據用於量測ERK1/2磷酸化之磷酸基-ERK1/ERK2套組(R&D Systems)，利用ELISA測試樣品。表8提供關於篩選命中選項在Fab或scFv格式下、在每毫升7.5 µg固定劑量下的拮抗活性之概要。

表8：篩選命中選項對PRLR、ERK1/2及STAT5之磷酸化之拮抗活性(如藉由ELISA對人類乳癌細胞株T47D之細胞溶解產物所測定)

抗體	在固定抗體劑量(7.5 µg/ml)下對磷酸化之抑制率(%)		
	PRLR	ERK1/2	STAT5
006-H08*	100	100	100
002-H06°	92	86	72
002-H08°	100	100	98
006-H07*	88	85	73
001-E06°	63	45	36
陰性對照物	2	9	0

*scFv格式，°Fab格式

實例 15

PRLR中和抗體抑制小鼠之泌乳

使成年NMRI雌性小鼠與NMRI雄性小鼠交配。在產後第1天，調整窩仔數為每隻泌乳母體8隻小鼠。自產後第1天開始，每天早晨測定後代之重量。泌乳母體保持未經處理(圖14A、圖14B中之實心圓形)或用非特異性抗體(每公斤

體重 10 mg；圖 14A、圖 14B 中之空心圓形)、或用含有鼠類 IgG2a 恆定域之 PRLR 中和抗體 005-C04(=IgG2a 005-C04；10 mg/kg，圖 14A、圖 14B 中之實心三角形)、或用 PRLR 中和抗體 IgG2a 005-C04(30 mg/kg，圖 14A、圖 14B 中之空心三角形)經腹膜內處理。組規模為每實驗組 5-6 隻泌乳母體。在產後第 1 天、第 3 天、第 6 天、第 9 天、第 10 天及第 12 天用特異性或非特異性對照抗體處理母體(在圖 14A、圖 14B 中用箭頭指示)。結果展示於圖 14 中。圖 14A 展示產後每一天之窩重增量，以佔第 1 天各別窩重之百分比表示。自產後第 8 天起，經 PRLR 中和抗體處理之母體之後代與保持未經處理或接受非特異性對照抗體之母體之後代之間的窩重增量存在顯著差異。歸因於倫理原因，在接受最高劑量 PRLR 中和抗體之母體之實驗組中，在產後第 10 天必須處死若干窩。在圖 14B 中，以不同方式圖示結果。展示逐日有差異的窩重增量，且以佔產後第 1 天之窩重之百分比表示。圖 14B 基本上展示圖 14A 中所示之圖的斜率。未處理母體或經非特異性抗體處理之母體之窩的每日窩重增量差異在產後第 1 天起始窩重之約 30% 上下波動。經每公斤體重 30 mg PRLR 中和抗體處理之母體之窩自第 7 天起的每日窩重增量有明顯大幅減小(相對於經非特異性抗體處理之母體之窩，* $p < 0.05$ ；*** $p < 0.005$)。若與經非特異性對照抗體處理之母體之窩相比，則自產後第 11 天起，經 10 mg/kg PRLR 中和抗體處理之母體之窩的每日窩重增量亦有顯著減小(相對於經非特異性抗體處理之母體之窩，

$p < 0.05$)。總之，PRLR中和抗體IgG2a 005-C04對泌乳抑制有劑量依賴性效應。圖14C展示不同實驗組之泌乳母體之乳腺的組織切片。給未處理母體及經非特異性對照抗體處理之母體的乳腺充滿了產生乳汁之乳腺管。相比之下，經PRLR中和抗體IgG2a 005-C04處理之母體有乳腺退化跡象。圖14C中之黑色箭頭指向乳腺組織中之脂肪島(參見特異性抗體IgG2a 005-C04對乳腺退化程度之劑量依賴性效應(圖14C))。另外，分析主要乳蛋白 β -酪蛋白(Csn-2)、乳清酸性蛋白質(WAP)及IGF-1於不同實驗組之母體之乳腺中的表現(圖14D)。相對於TATA盒結合蛋白質(TBP)之表現校正基因表現。PRLR中和抗體IgG2a 005-C04劑量依賴性地降低乳蛋白表現，而非特異性抗體(10 mg/kg)不具有任何顯著效應。

PRLR中和抗體IgG2a 005-C04劑量依賴性地阻斷泌乳且在泌乳小鼠中引起乳腺退化，表明其適用於泌乳抑制。

實例16

PRLR中和抗體適用於治療良性乳房疾病

活化PRLR突變或局部或全身性高催乳激素血症會引發良性乳房疾病。因此，採用在乳腺中誘導增強之增殖(良性乳房疾病之最嚴重的形式的特點)的高催乳激素血症小鼠模型。第0天，12週大的雌性Balb/c小鼠在腎包膜下接受垂體同源移植物或保持不接受手術。垂體同源移植小鼠保持未經處理，或在第0天、第3天、第7天、第11天及第15天，用非特異性抗體(10 mg/kg)、呈IgG1格式之PRLR中和

抗體 005-C04(=IgG1 005-C04; 10 mg/kg)、或 PRLR 中和抗體 IgG1 005-C04(30 mg/kg)經腹膜內處理。實驗組規模為 8-10 隻動物。在垂體移植後第 17 天，處死小鼠。在死亡前 2 小時，動物接受 BrdU 腹膜內注射以監測上皮細胞增殖。將左腹股溝乳腺固定於卡諾伊溶液(Carnoy's solution)中，且製備乳腺整體封裝標本並用 Carmine alaune 染色(圖 15A)。將右腹股溝乳腺固定於 4% 磷酸鹽緩衝福馬林中隔夜。接著，將乳腺包埋於石蠟中，且如先前所述進行 BrdU 免疫染色(Endocrinology 149(8):3952-3959;2009)。另外，進行 pSTAT5 免疫染色(來自 abcam 之抗 pSTAT5 抗體 ab32364，按 1:60 稀釋)以監測因 PRLR 中和抗體處理而受抑制之 PRLR 介導之信號傳導。圖 15A 展示不同實驗組之乳腺整體封裝標本之放大圖。不接受垂體之成年小鼠之乳腺顯示乳腺管及末端芽，而接受垂體同源移植物之小鼠有極度的側邊分枝及小泡結構形成。用非特異性抗體(10 mg/kg)處理不抑制側邊分枝及小泡結構形成。相比之下，用每公斤體重 10 mg 中和抗體 IgG1 005-C04 處理在 10 隻接受垂體同源移植物之動物的 8 隻中完全抑制側邊分枝，且用 30 mg/kg IgG1 005-C04 處理在 9 隻接受垂體同源移植物之動物的 9 隻中完全抑制側邊分枝。組織學分析及 BrdU 免疫染色展示於圖 15B 中。垂體同源移植引起不受非特異性抗體處理抑制之上皮增生，而在具有垂體同源移植物且經每公斤體重 10 mg 或 30 mg 劑量之 PRLR 中和抗體處理之小鼠中無上皮增生。在圖 15B 中，一些反映處於將要分裂之細胞週

期S期之細胞的BrdU陽性細胞以白色箭頭指示。經中和抗體IgG1 005-C04(每公斤體重30 mg)處理之小鼠顯示乳腺中之上皮細胞增殖幾乎完全被抑制。在圖15C中，一些對磷酸基-STAT5呈陽性之細胞以白色箭頭指示。用30 mg/kg IgG1 005-C04處理可完全抑制STAT5磷酸化，此表明完全阻斷PRLR介導之信號傳導。

圖15A、B及C之結果證明，PRLR中和抗體適用於治療乳腺病，一種乳腺良性增殖疾病。PRLR中和抗體抑制乳腺上皮細胞增殖及磷酸基STAT5-活化。

實例17

用PRLR中和抗體治療良性前列腺增生

在雄性Balb/c小鼠中藉由在8週大時，在腎包膜下移植兩個垂體來形成良性前列腺增生。對照組則不接受手術。接受垂體同源移植物之小鼠保持未經處理或接受非特異性抗體(10 mg/kg)或每公斤體重10 mg及30 mg劑量之含有鼠類IgG2a恆定域之PRLR中和抗體005-C04(=IgG2a 005-C04)的腹膜內注射。在垂體移植當天(=第0天)開始且在垂體移植後第3天、第7天、第11天、第15天、第18天、第22天及第25天，進行抗體注射。第28天處死小鼠。測定腹側前列腺之相對重量。結果展示於圖16中。垂體同源移植引起相對前列腺重量增加。用10 mg/kg及30 mg/kg PRLR中和抗體IgG2a 005-C04處理可減小前列腺重量，而用非特異性對照抗體處理則無任何作用。因此，PRLR中和抗體適於治療良性前列腺增生。

在垂體同源移植後第18天後，很明顯，接受垂體同源移植動物之動物的毛髮生長減弱。PRLR中和抗體在高催乳激素血症病狀下刺激毛髮生長。代表性照片展示於圖17中。因此，PRLR中和抗體可用於治療高催乳激素血症性毛髮減少。

實例18

PRLR中和抗體對毛髮生長之影響

如先前所述 (British Journal of Dermatology 2008; 159:300-305)，使用電動剃毛刀去除8週大的雄性及雌性C57BL/6小鼠之背毛。在一些組中藉由在腎包膜下作垂體同源移植來誘發高催乳激素血症，其餘組之動物為正常催乳激素血症。每週一次(在垂體同源移植當天，即第0天開始)用特異性PRLR抗體(IgG2a 005-C04)或非特異性對照抗體(30 mg/kg，腹膜內)處理動物。在第7天及第14天，進行後續抗體注射。在三週後，在帶粉紅色-白色的經剃毛之皮膚上可見再生長之毛呈黑色，且量測變成黑色之經剃毛區域所佔之百分比。在剃毛後15天殺死雌性小鼠，且在剃毛後18天處死雄性小鼠。

使用以下實驗組(組規模為6隻小鼠)：

1. 經剃毛之雌性
2. 具有垂體同源移植物的經剃毛之雌性
3. 具有垂體同源移植植物+每週一次用30 mg/kg非特異性抗體IgG2a 005-C04處理的經剃毛之雌性
4. 具有垂體同源移植植物+每週一次用30 mg/kg特異性抗

體處理的經剃毛之雌性

5. 每週一次用 30 mg/kg 非特異性抗體處理的經剃毛之雌性
6. 每週一次用 30 mg/kg 特異性抗體處理的經剃毛之雌性
7. 經剃毛之雄性
8. 具有垂體同源移植物的經剃毛之雄性
9. 具有垂體同源移植物+每週一次用 30 mg/kg 非特異性抗體處理的經剃毛之雄性
10. 具有垂體同源移植物+每週一次用 30 mg/kg 特異性抗體 IgG2a 005-C04 處理的經剃毛之雄性
11. 每週一次用 30 mg/kg 非特異性抗體處理的經剃毛之雄性
12. 每週一次用 30 mg/kg 特異性抗體處理的經剃毛之雄性

不同組之動物的代表性圖片展示於圖 18 中，圖 18 中指示再生長有毛髮之區域所佔的百分比。

PRLR 中和抗體在雄性及雌性小鼠中在高催乳激素血症及正常催乳激素血症病狀下刺激毛髮再生長，而非特異性抗體則不然。因此，PRLR 中和抗體適用於治療女性及男性在高催乳激素血症及正常催乳激素血症病狀下之毛髮減少。

實例 19

PRLR 中和抗體對增強之乳腺上皮細胞增殖的抑制

為了測試 PRLR 中和抗體對由組合激素療法(亦即雌激素加助孕素療法)活化之增強之乳腺上皮細胞增殖的影響，

採用允許定量子宮及乳腺中之增殖效應的先前描述之小鼠模型 (Endocrinology 149:3952-3959, 2008)。對6週大的C57BL/6雌性小鼠切除卵巢。在卵巢切除術後2週，藉由每日注射媒劑(乙醇/花生油10%/90%)或100 ng雌二醇加100 mg/kg助孕酮經皮下處理動物，持續兩週。每週一次藉由腹膜內注射呈鼠類IgG2a格式之PRLR中和抗體(10 mg/kg及30 mg/kg)或非特異性抗體(30 mg/kg)來處理動物，持續三週。在卵巢切除術後第36天，進行屍檢。在死亡之前兩小時，動物接受溶解於磷酸鹽緩衝生理鹽水中之BrdU(每公斤體重70 mg)的腹膜內注射。如先前所描述，分析右腹股溝乳腺2/3處近端之乳腺上皮細胞增殖(BrdU免疫染色)(Endocrinology 149:3952-3959, 2008)。

實驗包含以下組：

1. 經媒劑處理之卵巢切除動物
2. 經100 ng雌二醇處理之卵巢切除動物
3. 經100 ng雌二醇(E)及100 mg/kg助孕酮(P)處理之卵巢切除動物
4. 經E+P及10 mg/kg特異性抗體005-C04處理之卵巢切除動物
5. 經E+P及30 mg/kg特異性抗體005-C04處理之卵巢切除動物
6. 經E2+P及30 mg/kg非特異性對照抗體處理之卵巢切除動物

結果展示於圖19中。評估乳腺之4個橫截面內增殖的乳

腺管上皮細胞之絕對數目。中值展示成水平橫條。經媒劑處理之卵巢切除小鼠之上皮細胞增殖相當低。雌二醇處理對上皮細胞增殖產生一定的刺激，在雌激素加助孕酮處理下觀測到最大乳腺上皮細胞增殖(圖19)。用催乳激素受體中和抗體005-C04處理引起乳腺上皮細胞增殖劑量依賴性降低，幾乎回至單獨雌二醇之程度，而非特異性對照抗體則不然。

因此，PRLR中和抗體適用於治療組合激素療法(亦即雌二醇加助孕酮治療)下增強之乳腺上皮細胞增殖。

實例 20

用 PRLR 中和抗體治療 SHN 小鼠之子宮腺肌症(=子宮內子宮內膜異位)

為了測試 PRLR 中和抗體在子宮內膜異位症中之功效，採用依賴於全身性高催乳激素血症之 SHN 小鼠子宮腺肌症模型(Acta anat. 116:46-54, 1983)。藉由在腎包膜下給7週大的雌性小鼠作垂體同源移植而在 SHN 小鼠中誘導高催乳激素血症(Acta anat. 116:46-54, 1983)。在垂體同源移植後1週開始，經腹膜內投與 PRLR 中和抗體(10 mg/kg 或 30 mg/kg)或非特異性抗體(30 mg/kg)。如先前描述，評定腺組織對子宮肌層之浸潤(Laboratory Animal Science 1998, 48:64-68)。每週一次及兩次藉由腹膜內注射來進行抗體處理，持續9週。在屍檢時(在垂體移植後第70天)，將子宮於緩衝之4%福馬林中固定隔夜並包埋於石蠟中。如下評定子宮腺肌症(=子宮內子宮內膜異位)程度：

等級 0= 無子宮腺肌症

等級 0.5= 子宮肌層內層在同心方向上鬆馳

等級 1= 子宮內膜腺體侵入子宮肌層內層

等級 2= 子宮內膜腺體在子宮肌層內層與外層之間

等級 3= 子宮內膜腺體侵入子宮肌層外層

等級 4= 子宮內膜腺體位於子宮肌層外層外部

實驗包含以下實驗組：

1. 未經垂體移植之動物，亦即正常催乳激素血症小鼠
2. 經垂體移植之動物，亦即高催乳激素血症小鼠
3. 經垂體移植之動物，每週用 30 mg/kg劑量之非特異性
對照抗體處理一次
4. 經垂體移植之動物，每週用 30 mg/kg劑量之非特異性
對照抗體處理兩次
5. 經垂體移植之動物，每週用 10 mg/kg劑量之呈鼠類
IgG2a格式之催乳激素受體中和抗體 005-C04處理一次
6. 經垂體移植之動物，每週用 10 mg/kg劑量之呈鼠類
IgG2a格式之催乳激素受體中和抗體 005-C04處理兩次
7. 經垂體移植之動物，每週用 30 mg/kg劑量之呈鼠類
IgG2a格式之催乳激素受體中和抗體 005-C04處理一次
8. 經垂體移植之動物，每週用 30 mg/kg劑量之呈鼠類
IgG2a格式之催乳激素受體中和抗體 005-C04處理兩次

結果展示於圖 20 中。個別地給予各處理組中之各動物的
評分，且各處理組之中值以水平橫條展示。正常催乳激素
血症小鼠在某種程度上患有子宮內子宮內膜異位(中值疾

病評分=0.25)。由垂體同源移植所致之高催乳激素血症增加疾病評分，且較多動物患有該疾病(中值疾病評分=2.5)。而每週用30 mg/kg非特異性抗體處理一或兩次對疾病無影響，用特異性中和抗體處理顯示疾病評分有劑量依賴性降低。值得注意的是，每週接受10 mg/kg或30 mg/kg特異性抗體兩次之所有動物完全被治癒，且其疾病評分顯著低於正常催乳激素血症小鼠之疾病評分(圖20)。因此，PRLR中和抗體適用於治療女性之子宮內子宮內膜異位(=子宮腺肌症)及子宮外子宮內膜異位症。

【圖式簡單說明】

圖1：催乳激素-mRNA(PRL-mRNA)於健康女性及罹患子宮內膜異位症之女性的人類子宮內膜及病灶(異位組織)中之表現(藉由即時TaqMan PCR分析來分析)。

圖2：催乳激素受體-mRNA(PRLR-mRNA)於健康女性及罹患子宮內膜異位症之女性的人類子宮內膜及病灶(異位組織)中之表現(藉由即時TaqMan PCR分析來分析)。

圖3：對PRLR基因在大鼠組織中之表現的北方墨點分析結果。PRLR之基因表現顯示在胎盤及前列腺中有高度表現。

圖4：對PRLR在經不同激素處理之大鼠前列腺中的表現之西方墨點分析結果。與完整動物之媒劑處理相比，完整大鼠之雌二醇處理及閹割引起PRLR蛋白質在大鼠前列腺中上調，而完整大鼠之二氫睪固酮處理對PRLR在前列腺中之表現無影響。

圖 5：PRLR 中和抗體及非特異性對照抗體對催乳激素活化之 Ba/F(=Baf)細胞增殖(穩定地表現人類 PRLR)之抑制。測定以下抗體在 IgG1 格式下之 IC_{50} 值：005-C04(實心圓形)：1.29 $\mu\text{g/ml}$ =8.6 nM；006-H08(空心圓形)：0.15 $\mu\text{g/ml}$ =1 nM；HE06.642(實心三角形)：0.34 $\mu\text{g/ml}$ =2.2 nM；002-H06(空心三角形)：0.54 $\mu\text{g/ml}$ =3.6 nM；002-H08(實心正方形)：0.72 $\mu\text{g/ml}$ =4.8 nM；非特異性對照抗體(空心正方形)：對細胞增殖無抑制。

圖 6：PRLR 中和抗體及非特異性對照抗體對催乳激素誘導之大鼠淋巴瘤細胞增殖(NB2細胞)之抑制。測定以下 IC_{50} 值：XHA06.642(實心圓形)：10 $\mu\text{g/ml}$ =67 nM；XHA06.983(空心圓形)：對大鼠淋巴瘤細胞增殖無影響；非特異性對照抗體(實心三角形)：在 10 $\mu\text{g/ml}$ 下無作用。

圖 7：PRLR 中和抗體及非特異性對照抗體對 T47D 細胞中催乳激素刺激之 STAT5 磷酸化的抑制。

非特異性對照抗體(FITC)不抑制 T47D 細胞中之 STAT5 磷酸化。相比之下，抗體 XHA06.642、005-C04(=IgG1 005-C04)及 006-H08(=IgG1 006-H08)以劑量依賴性方式抑制 T47D 細胞中之 STAT5 磷酸化。

圖 8：使用經人類催乳激素受體(hPRLR)穩定轉染且在催乳激素反應元件(LHRE)控制下短暫表現螢光素酶基因之 HEK293 細胞所得知的 PRLR 中和抗體及非特異性對照組對催乳激素活化之螢光素酶報導體基因活性的影響。測定以下抗體在 IgG1 格式下之 IC_{50} 值：006-H08(實心圓形)：0.83

$\mu\text{g/ml}=5.5 \text{ nM}$; HE06.642(空心圓形) : $0.63 \mu\text{g/ml}=4.2 \text{ nM}$; 非特異性對照抗體(實心三角形) : 對螢光素酶活性無抑制。

圖9 : 使用經鼠類催乳激素受體(mPRLR)穩定轉染且在催乳激素反應元件(LHRE)控制下短暫表現螢光素酶基因之HEK293細胞所得知的PRLR中和抗體及非特異性對照組對催乳激素活化之螢光素酶報導體基因活性的影響。測定以下抗體在IgG1格式下之 IC_{50} 值 : 005-C04(實心三角形) : $0.45 \mu\text{g/ml}=3 \text{ nM}$; XHA06.642(實心圓形) : $>>50 \mu\text{g/ml}>>333 \text{ nM}$; 非特異性對照抗體(空心圓形) : 對螢光素酶活性無抑制。

圖10 : 催乳激素受體中和抗體及非特異性對照抗體對催乳激素活化之Ba/F(=Baf)細胞增殖(穩定地表現鼠類催乳激素受體)之抑制。測定以下抗體在IgG1格式下之 IC_{50} 值 : 非特異性FITC抗體(實心正方形) : 對細胞增殖無抑制 ; HE06.642(實心圓形) : $>>>30 \mu\text{g/ml}>>>200 \text{ nM}$; 001-E06(空心圓形) : $43.7 \mu\text{g/ml}=291 \text{ nM}$; 001-D07(實心三角形) : $16.5 \mu\text{g/ml}=110 \text{ nM}$; 005-C04(空心三角形) : $0.74 \mu\text{g/ml}=4.9 \text{ nM}$ 。

圖11 : 經磷酸鹽緩衝生理食鹽水(=媒劑)、非特異性對照抗體(FITC IgG1)或中和抗體IgG1 005-C04(=005-C04)處理之雌性小鼠的受孕率(A)及平均窩仔數(B)。受孕率為87.5%(經媒劑處理之雌性小鼠)、75%(經10 mg/kg非特異性抗體處理之雌性小鼠)、100%(經10 mg/kg IgG1 005-C04

處理之雌性小鼠)及0%(經30 mg/kg IgG1 005-C04處理之雌性小鼠)。平均窩仔數為10.9隻動物(經媒劑處理之雌性小鼠)、12.3隻動物(經10 mg/kg非特異性抗體處理之雌性小鼠)、13隻動物(經10 mg/kg IgG1 005-C04處理之雌性小鼠)及0隻動物(經30 mg/kg IgG1 005-C04處理之雌性小鼠)。

圖 12：根據Johnson及Wu(Nucleic Acids Res. 2000, 28, 214-218)之構架胺基酸位置之Kabat編號。

圖 13：對所選抗PRLR抗體(005-C04、001-E06、HE06642)之FACS分析結果。測定抗體在固定濃度下於表現人類及小鼠PRLR之HEK293細胞上相較於不表現PRLR之親本細胞株的結合情況。

圖 14A：產後各天之窩重增量(以佔產後第1天獲得之窩重的百分比表示)。展示未處理母體(實心圓形)、經10 mg/kg非特異性鼠類IgG2a抗體處理之母體(空心圓形)、及經10 mg/kg(實心三角形)及30 mg/kg(空心三角形)含鼠類IgG2a恆定域之中和抗體005-C04(=IgG2a 005-C04)處理之母體的窩重增量。箭頭指示進行抗體注射之日。自產後第8天起，經30 mg/kg IgG2a 005-C04處理之母體的窩重增量明顯減小。

圖 14B：逐日增加之窩重增量(以佔產後第1天之窩重的百分比表示)。展示未處理母體(實心圓形)、經10 mg/kg非特異性鼠類IgG2a抗體處理之母體(空心圓形)、經10 mg/kg(實心三角形)及30 mg/kg(空心三角形)含鼠類IgG2a恆定域之中和抗體005-C04(=IgG2a 005-C04)處理之母體的

窩的結果。基本上，圖 14B 呈現圖 14A 中所示之圖的斜率。未處理母體及經 10 mg/kg 非特異性抗體處理之母體的每日窩重增量在產後第 1 天窩重之約 30% 上下波動。相比之下，用 30 mg/kg IgG2a 005-C04 處理母體引起增重自第 7 天起明顯減小(相對於經非特異性抗體處理之母體的窩， $*p<0.05$ ； $***p<0.005$)，而用 10 mg/kg IgG2a 005-C04 處理引起每日體重增加自第 11 天起明顯減小(相對於經非特異性抗體處理之母體的窩， $p<0.05$)。箭頭指示施用抗體之日。

圖 14C：泌乳母體之乳腺的組織切片。給未處理母體或經非特異性抗體處理之母體的乳腺充滿了產生乳汁之乳腺管。相比之下，由脂肪島(黑色箭頭)之出現所證明之乳腺退化被 IgG2a 005-C04 中和抗體劑量依賴性地誘導。

圖 14D：泌乳母體之乳腺中的乳蛋白質表現。在經 PRLR 中和抗體 IgG2a 005-C04 處理之母體中乳蛋白質 β 酪蛋白(Csn-2)、乳清酸性蛋白質(WAP)及 IGF-1 之表現以劑量依賴性方式被降低，但在非特異性抗體下則不然。相對於 TATA 盒結合蛋白質(TBP)之表現校正基因表現。

圖 15A：良性乳房疾病之高催乳激素血症小鼠模型中側枝及小泡樣結構之形成。PRLR 中和抗體 IgG1 005-C04 (=005-C04) 在 10 mg/kg 及 30 mg/kg 下抑制接受垂體同源移植植物之小鼠的側邊分枝及小泡樣結構形成。

圖 15B：良性乳房疾病之高催乳激素血症小鼠模型中上皮增生及上皮細胞增殖之程度。以白色箭頭標出一些 BrdU

陽性細胞。PRLR中和抗體IgG1 005-C04(=005-C04)阻斷乳腺之上皮增生及上皮細胞增殖。

圖 15C：良性乳房疾病之高催乳激素血症小鼠模型中STAT5磷酸化之程度。以白色箭頭指示一些磷酸基-STAT5陽性細胞。PRLR中和抗體IgG1 005-C04(=005-C04)當以30 mg/kg之劑量施用時完全阻斷STAT5磷酸化。

圖 16：含有鼠類IgG2a恆定域之PRLR中和抗體005-C04(=IgG2a 005-C04)對前列腺生長之抑制。與未處理假手術小鼠相比，垂體同源移植刺激前列腺生長。用10 mg/kg劑量及30 mg/kg劑量之PRLR中和抗體處理抑制前列腺生長(相對於未處理假手術小鼠，*** $p < 0.005$)。

圖 17：在高催乳激素血症存在下，PRLR中和抗體刺激毛髮生長。照片在對實例17及圖16中所述之實驗中所用之雄性小鼠作垂體同源移植(及剃毛)後三週獲取。高催乳激素血症抑制剃毛區域中毛髮再生長。PRLR中和抗體在高催乳激素血症病狀下在10 mg/kg及30 mg/kg 005-C04(=IgG2a 005-C04)劑量下刺激毛髮再生長，但非特異性抗體則不然。

圖 18：在高催乳激素血症及正常催乳激素血症雄性及雌性小鼠中，PRLR中和抗體刺激剃毛區域之毛髮再生長，但非特異性抗體則不然(實例18)。因此，PRLR中和抗體適用於治療男性(圖18B)及女性(圖18A)在正常催乳激素血症及高催乳激素血症病狀下之毛髮減少。

圖 19：PRLR中和抗體抑制繼組合激素療法(亦即組合之

雌激素加助孕素療法)後乳腺中增強之上皮細胞增殖，但非特異性對照抗體則不然。

評估乳腺之4個橫截面內增殖的乳腺管上皮細胞之絕對數目，且中值在圖中展示成水平橫條。經媒劑處理之卵巢切除小鼠之上皮細胞增殖相當低(中值=0)。雌二醇處理對上皮細胞增殖產生一定的刺激(中值=9)，在雌激素加助孕酮處理下觀測到最大乳腺上皮細胞增殖(中值=144)。用催乳激素受體中和抗體005-C04處理(用10 mg/kg 005-C04處理後，中值=84；用30 mg/kg 005-C04處理後，中值=27)引起乳腺上皮細胞增殖劑量依賴性降低，幾乎回至單獨雌二醇之程度，而非特異性對照抗體則不然(中值=154)。

因此，PRLR中和抗體適於治療組合激素療法(亦即雌二醇加助孕酮治療)下增強之乳腺上皮細胞增殖。

圖 20：PRLR中和抗體抑制小鼠之子宮內子宮內膜異位，但非特異性對照抗體則不然。結果以如實例20中所述之疾病評分展示。各實驗組之中值疾病評分以水平橫條指示。正常催乳激素血症小鼠在某種程度上患有子宮內子宮內膜異位(中值疾病評分=0.25)。由垂體同源移植所致之高催乳激素血症增加疾病評分，且較多動物患有該疾病(中值疾病評分=2.5)。而每週用30 mg/kg非特異性抗體處理一次(中值評分=2.5)或兩次(中值評分=2)對疾病無影響，用特異性中和抗體處理顯示患病動物之數目有劑量依賴性減少；在使用特異性抗體之所有情況下，中值疾病評分均為零。值得注意的是，每週接受10 mg/kg或30 mg/kg特異性

抗體兩次之所有動物完全被治癒，且其疾病評分顯著低於正常催乳激素血症小鼠之疾病評分。因此，PRLR中和抗體適用於治療女性之子宮內子宮內膜異位(=子宮腺肌症)及子宮外子宮內膜異位症。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99143326

※申請日：99.12.10

※IPC 分類：C07K; A61K; A61P

一、發明名稱：(中文/英文)

催乳激素受體中和抗體及其治療用途

A61k 39/395 (2006.01)

A61p 15/00 (2006.01)

A61p 35/00 (2006.01)

NEUTRALIZING PROLACTIN RECEPTOR ANTIBODIES AND THEIR
THERAPEUTIC USE

二、中文發明摘要：

本發明係有關催乳激素受體中和抗體002-H08及抗原結合片段、含其之醫藥組合物及其在以下方面之用途：治療或預防由催乳激素受體介導之良性病症及適應症，諸如子宮內膜異位症、子宮腺肌症、雌性非激素性避孕、良性乳房疾病及乳腺痛、泌乳抑制、良性前列腺增生、類纖維瘤、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少；及在組合激素療法中用以抑制乳腺上皮細胞增殖之聯合治療。本發明抗體阻斷催乳激素受體介導之信號傳導。

三、英文發明摘要：

The present invention is directed to the neutralizing prolactin receptor antibody 002-H08, and antigen binding fragments, pharmaceutical compositions containing them and their use in the treatment or prevention of benign disorders and indications mediated by the prolactin receptor such as endometriosis, adenomyosis, non-hormonal female contraception, benign breast disease and mastalgia, lactation inhibition, benign prostate hyperplasia, fibroids, hyper- and normoprolactinemic hair loss, and cotreatment in combined hormone therapy to inhibit mammary epithelial cell proliferation. The antibodies of the invention block prolactin receptor-mediated signaling.

七、申請專利範圍：

1. 一種抗體或抗原結合片段，其中該抗體拮抗催乳激素受體介導之信號傳導。
2. 如請求項1之抗體，其結合於該催乳激素受體之細胞外域及其人類多型變異體之抗原決定基，其中該催乳激素受體之細胞外域之胺基酸序列對應於SEQ ID NO: 70，且其核酸序列對應於SEQ ID NO: 71。
3. 如請求項2之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或該抗原結合片段與抗體002-H08競爭。
4. 如請求項3之抗體或抗原結合片段，
 - a. 其中可變重鏈及輕鏈區之胺基酸序列在可變重鏈域中與SEQ ID NO: 36之一致性及在可變輕鏈域中與SEQ ID NO: 42之一致性為至少60%，更佳為70%，更佳為80%、或90%，或甚至更佳為95%，或
 - b. 其中CDR之胺基酸序列在重鏈域中與SEQ ID NO: 3、9及14之一致性及在可變輕鏈域中與SEQ ID NO: 20、24及31之一致性為至少60%，更佳為70%，更佳為80%，更佳為90%，或甚至更佳為95%。
5. 一種抗體或抗原結合片段，其包含如請求項1至4中任一項之抗體的CDR，其中其可變重鏈含有對應於SEQ ID NO: 3、9及14之CDR序列，且其可變輕鏈含有對應於SEQ ID NO: 20、24及31之CDR序列。
6. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體002-H08包含對應於如SEQ ID NO: 48之核酸序列及

如 SEQ ID NO: 36 之胺基酸序列的可變重鏈區，及具有如 SEQ ID NO: 54 之核酸序列及如 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列的可變輕鏈區。

7. 如請求項 3 之抗體或抗原結合片段，其中該抗體含有 1、2、3、4、5 或 6 個對應於 SEQ ID NO: 3、9、14、20、24 及 31 之 CDR。
8. 如請求項 1 至 4 中任一項之抗體，其中該抗體由特異性結合於胺基酸序列如 SEQ ID NO: 70 及 SEQ ID NO: 70 之人類多型變異體胺基酸位置 1 至 210 所示的 PRLR 之一或多個區或對該一或多個區具有高親和力的抗原結合區組成，其中該親和力為至少 100 nM，較佳為小於約 100 nM，更佳為小於約 30 nM，甚至更佳為親和力小於約 10 nM，或甚至更佳為親和力小於 1 nM。
9. 如請求項 1 至 4 中任一項之抗體，其中其重鏈恆定區為經修飾或未經修飾之 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。
10. 一種分離之核酸序列，其編碼如請求項 1 至 9 中任一項之抗體或抗原結合片段。
11. 如請求項 10 之分離之核酸序列，其中該核酸序列如表 5 所示。
12. 一種表現載體，其包含如請求項 10 或 11 之核酸序列。
13. 一種宿主細胞，其包含如請求項 12 之載體或如請求項 10 或 11 之核酸分子，其中該宿主細胞可為較高等真核宿主細胞，諸如哺乳動物細胞；較低等真核宿主細胞，諸如酵母細胞；且可為原核細胞，諸如細菌細胞。

14. 一種使用如請求項13之宿主細胞來產生抗體或抗原結合片段的方法，該方法包含在適合之條件下培養如請求項13之宿主細胞及回收該抗體。
15. 一種抗體或抗原結合片段，其係藉由如請求項14之方法來產生。
16. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其被純化至至少95重量%均質性。
17. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係作為藥劑。
18. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至9中任一項之抗體或抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑，該載劑包含賦形劑及助劑。
19. 一種套組，其包含如請求項1至9中任一項之抗體包裝於一容器中，該抗體包含治療有效量之抗體002-H08或其成熟變異體，該套組視情況含有第二治療劑，且進一步包含黏貼於該容器上或與該容器包裝在一起之標籤，該標籤描述該容器之內含物且提供關於該容器之內含物於以下用途的指示及/或說明：治療子宮內膜異位症、子宮腺肌症、良性乳房疾病及乳腺痛、泌乳抑制、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少、良性前列腺增生、類纖維瘤，或用於雌性非激素性避孕，或治療接受組合激素療法(亦即雌激素加助孕素療法)以抑制乳腺上皮細胞增殖之女性。
20. 一種PRLR中和抗體或抗原結合片段，其係用於治療及/

或預防子宮內膜異位症及子宮腺肌症(子宮內子宮內膜異位)。

21. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係用於治療及/或預防子宮內膜異位症及子宮腺肌症(子宮內子宮內膜異位)。
22. 一種PRLR中和抗體或抗原結合片段，其係用於雌性避孕。
23. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係用於雌性避孕。
24. 一種PRLR中和抗體或抗原結合片段，其係用於治療良性乳房疾病及乳腺痛。
25. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係用於治療良性乳房疾病及乳腺痛。
26. 一種PRLR中和抗體或抗原結合片段，其係用於抑制泌乳。
27. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係用於抑制泌乳。
28. 一種PRLR中和抗體或抗原結合片段，其係用於治療良性前列腺增生。
29. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係用於治療良性前列腺增生。
30. 一種PRLR中和抗體或抗原結合片段，其係用於治療高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少。
31. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係用

於治療高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少。

32. 一種PRLR中和抗體或抗原結合片段，其係用於治療接受組合激素療法之女性。
33. 如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其係用於治療接受組合激素療法之女性。
34. 一種如請求項32或33之抗體或抗原結合片段的用途，其係用於製造用以治療接受組合激素療法之女性的藥劑，其中該組合激素療法為雌激素加助孕素療法。
35. 一種如請求項1至9中任一項之抗體或呈如請求項18之包含如請求項1至9中任一項之PRLR抗體或抗原結合片段的醫藥組合物形式之抗體的用途，其係用於製造適於非經腸投與之藥劑，其中非經腸傳遞之方法包括局部、動脈內、肌肉內、皮下、髓內、鞘內、心室內、靜脈內、腹膜內、子宮內、陰道或鼻內投與。
36. 如請求項18之醫藥組合物，其包含如請求項1至9中任一項之PRLR抗體或抗原結合片段與至少一種其他藥劑組合。
37. 一種如請求項1至9中任一項之抗體或抗原結合片段的用途，其係用於製造用於以下用途之藥劑：治療子宮內膜異位症、子宮腺肌症、良性乳房疾病及乳腺痛、泌乳抑制、高催乳激素血症性及正常催乳激素血症性毛髮減少、良性前列腺增生、類纖維瘤，或用於雌性非激素性避孕，或治療接受組合激素療法(亦即雌激素加助孕素療法)以抑制乳腺上皮細胞增殖之女性。

八、圖式：

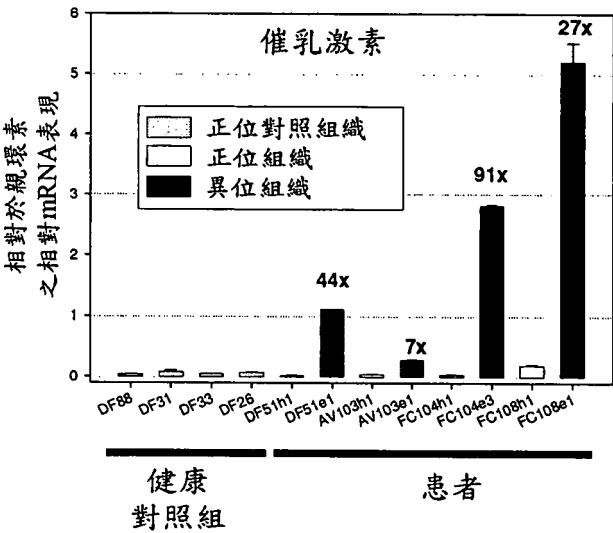


圖1

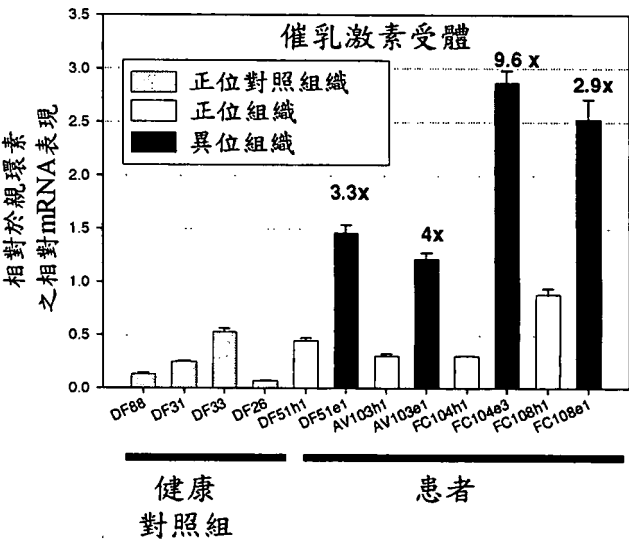


圖2

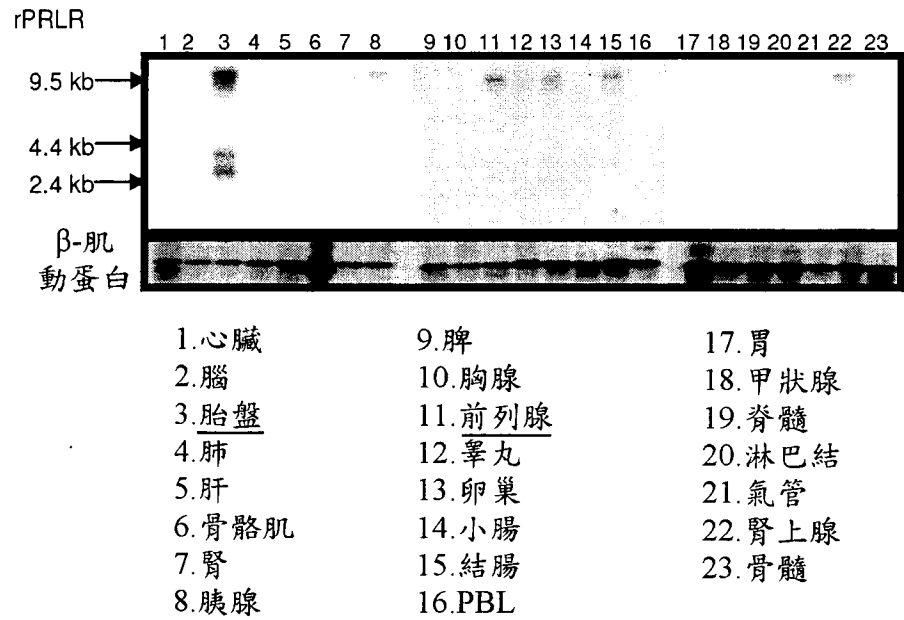


圖3

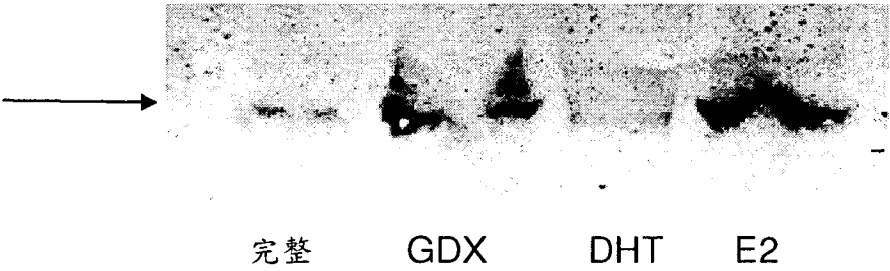


圖4

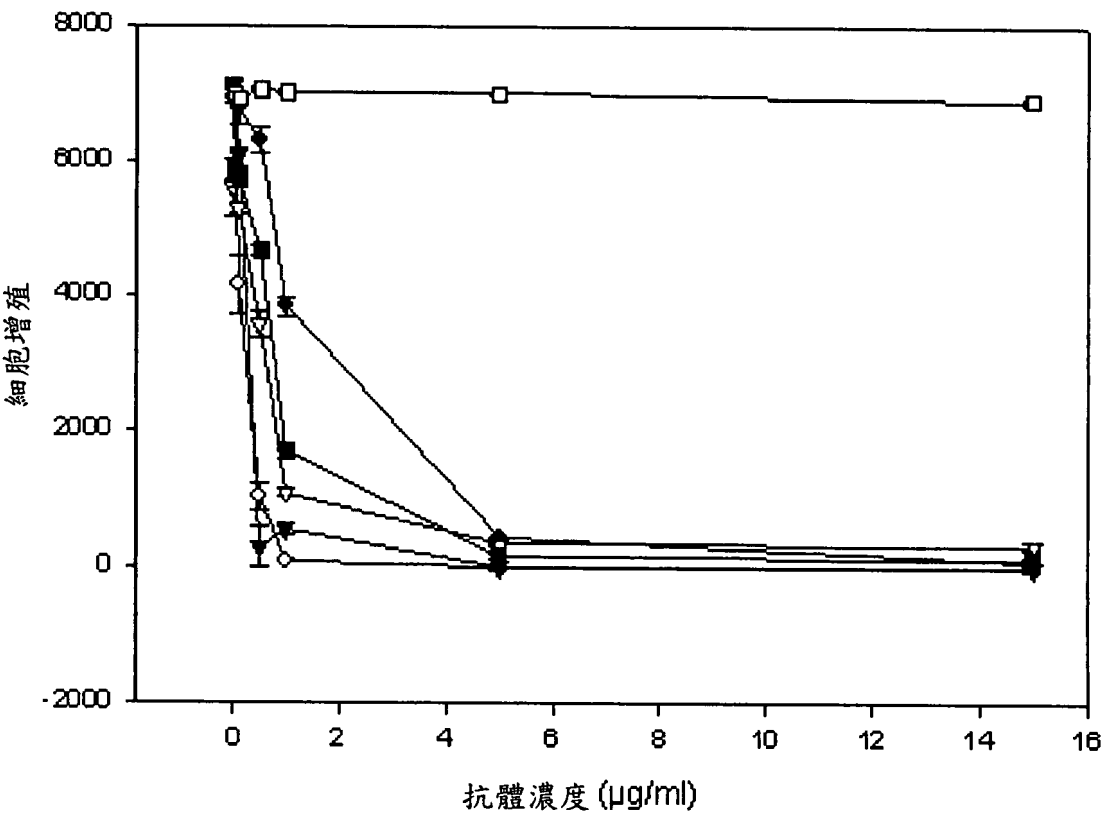


圖5

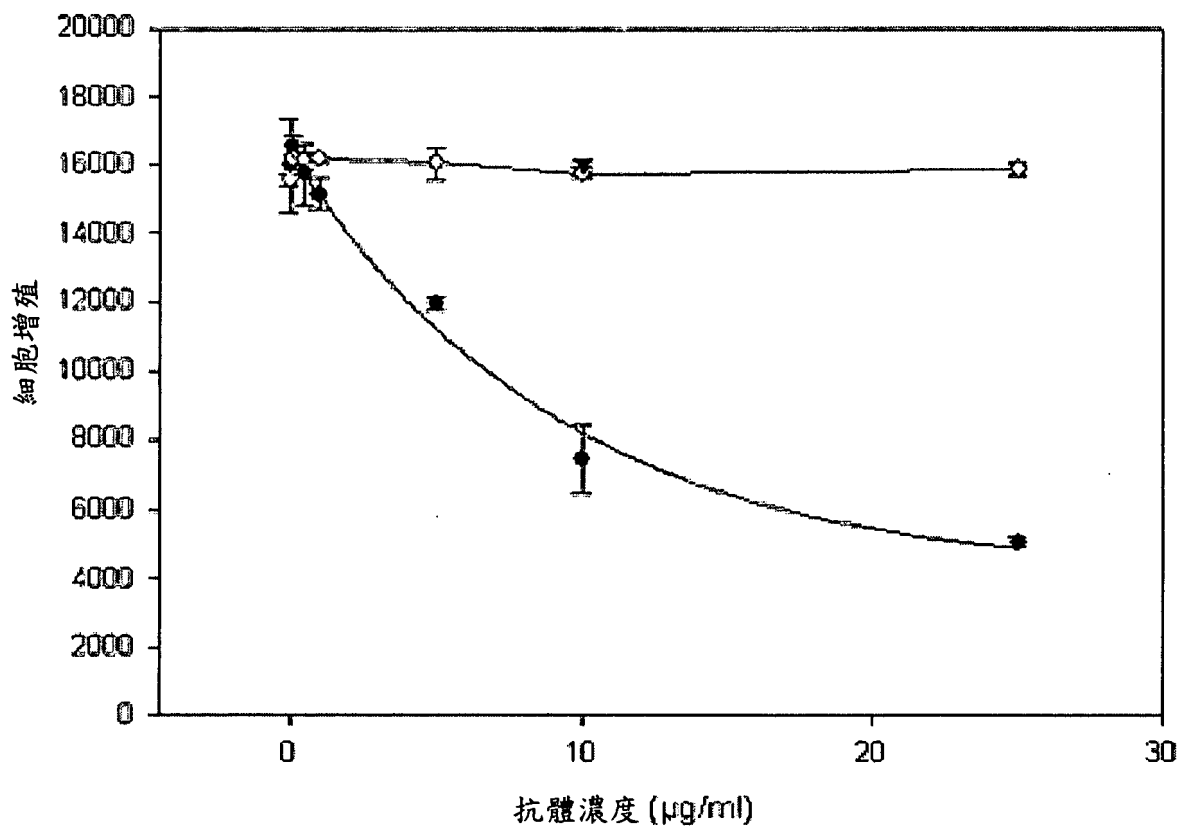


圖6

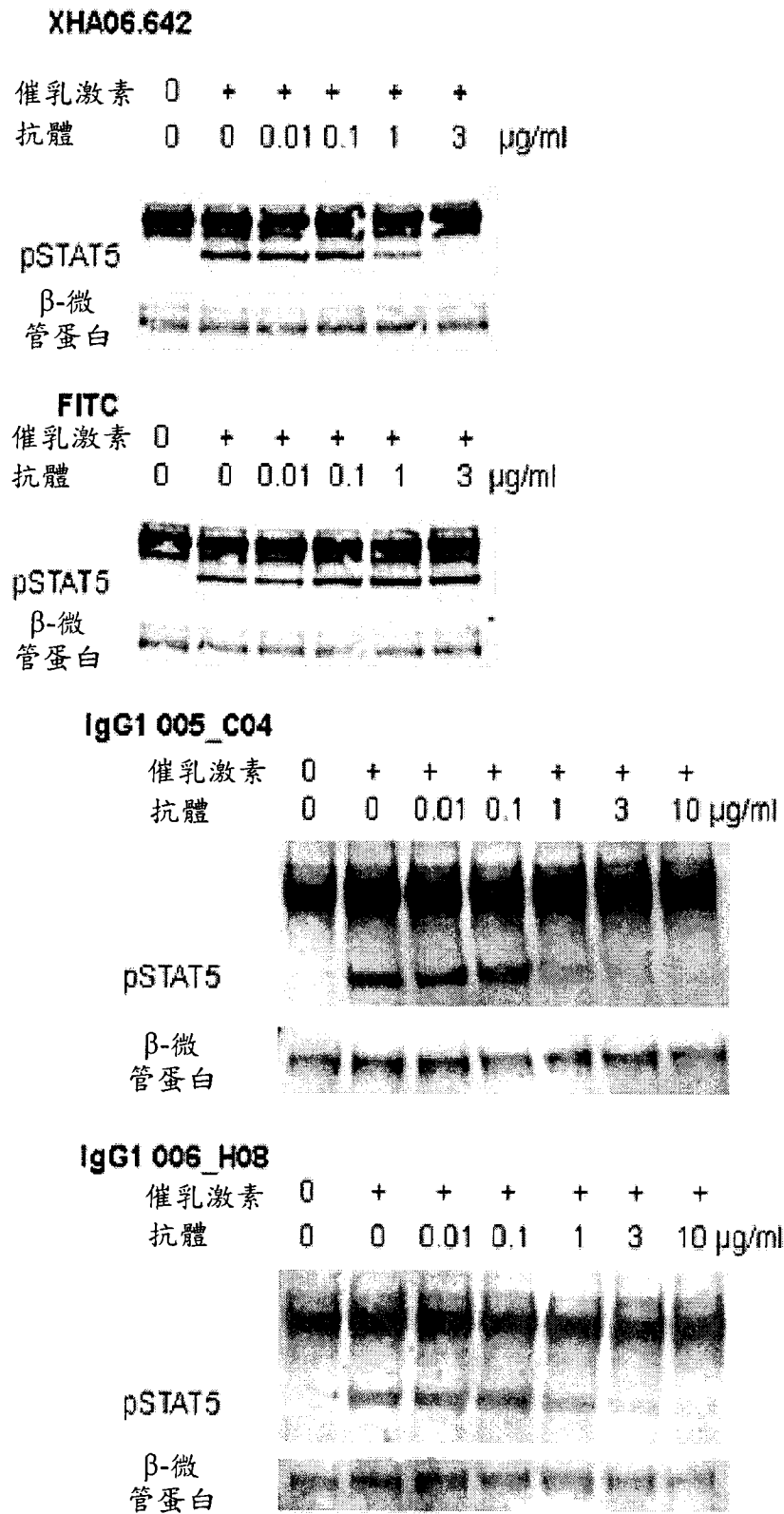


圖 7

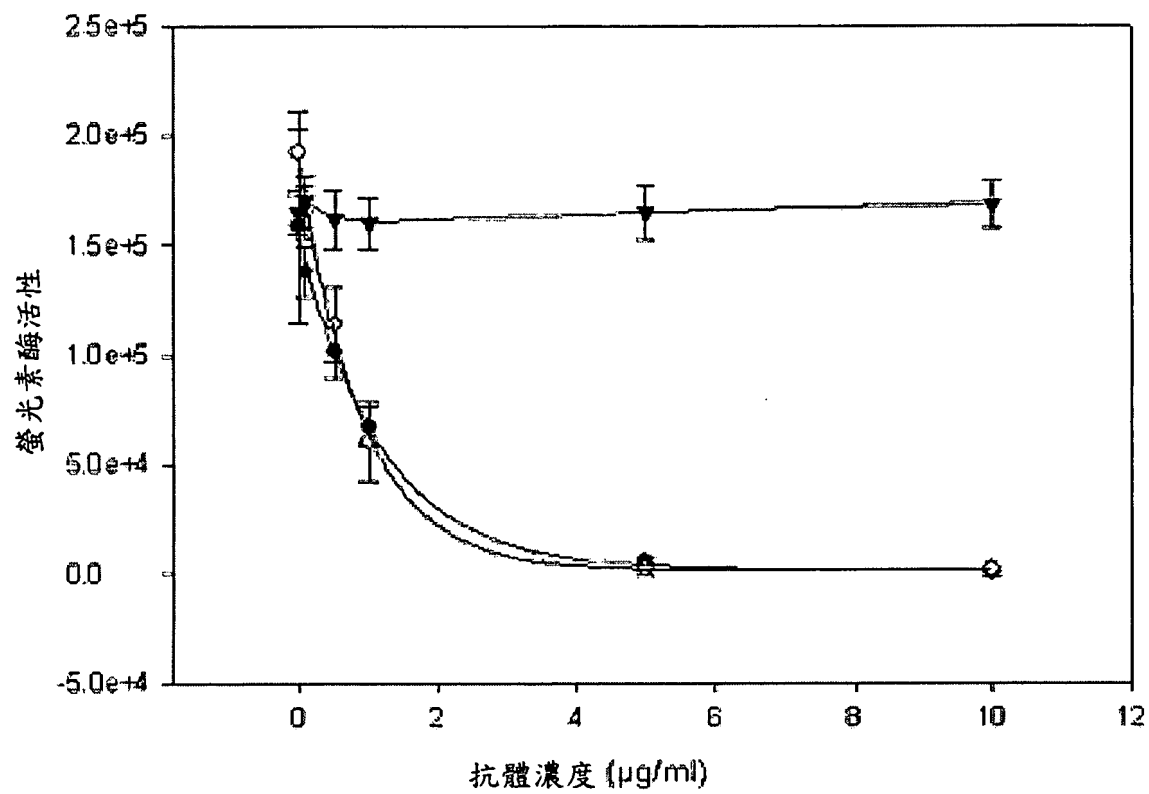


圖8

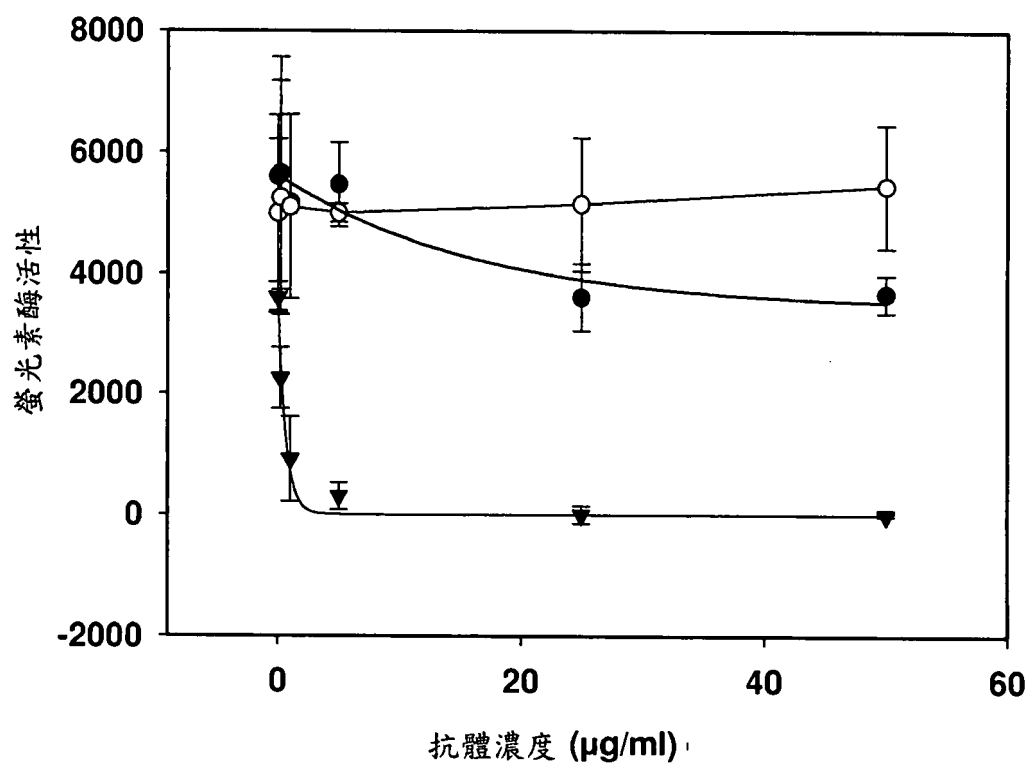


圖9

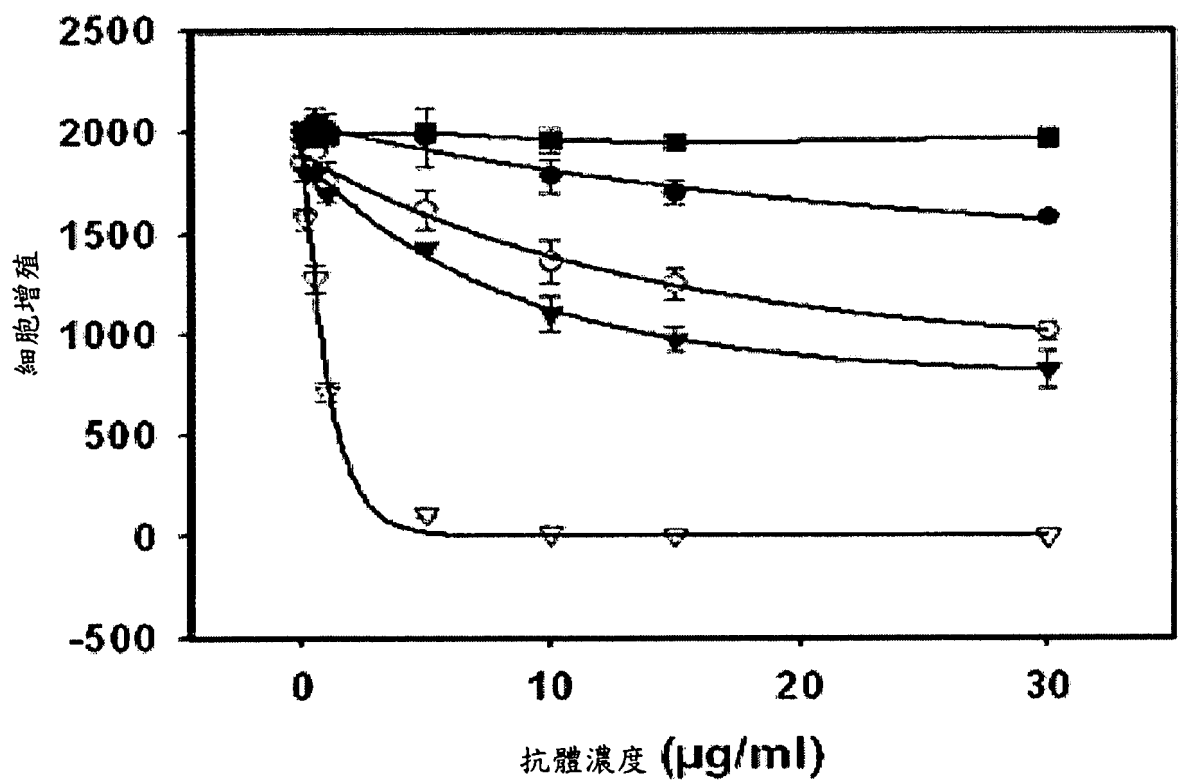


圖10

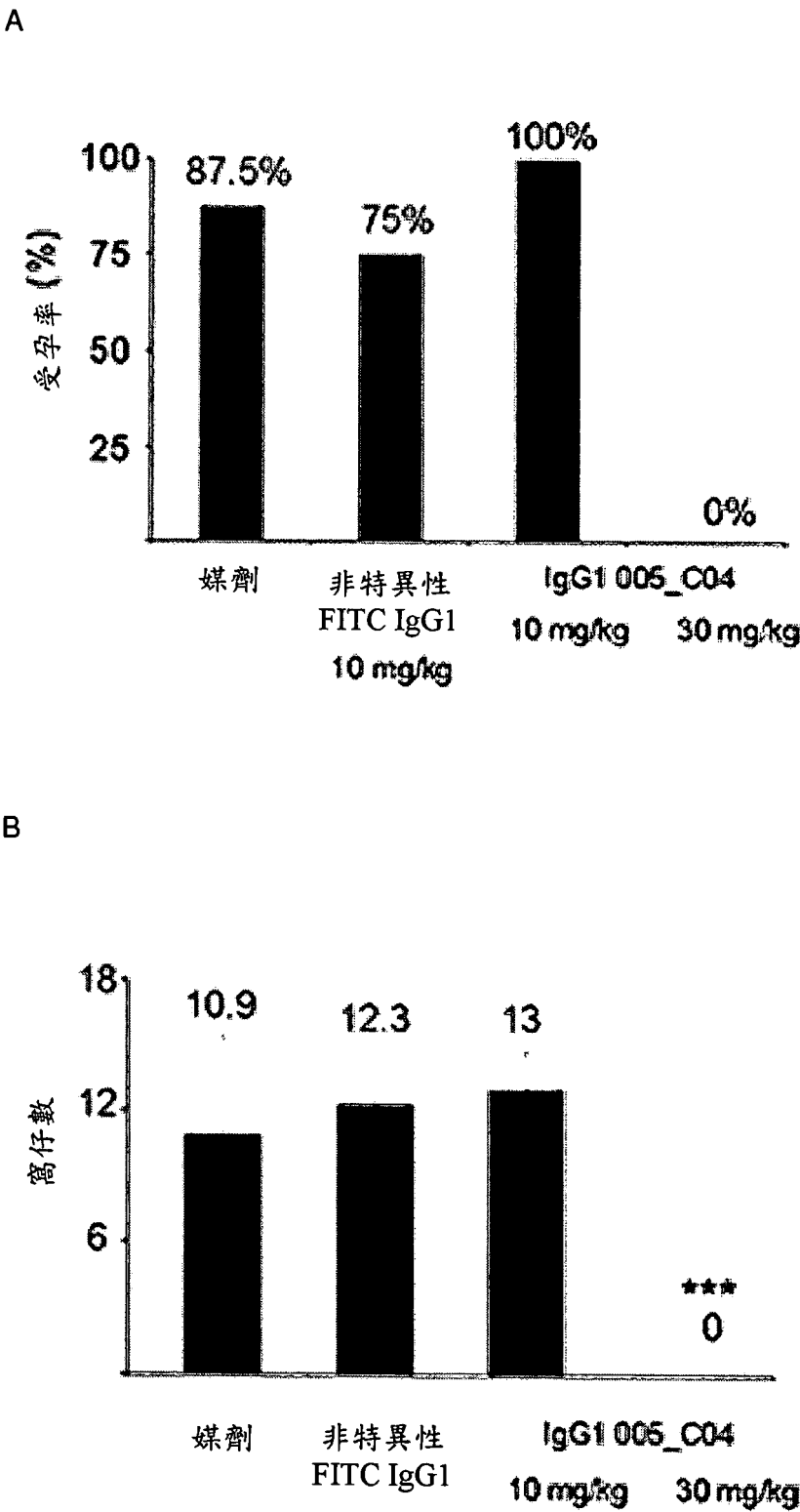


圖 11

VL鍵:	
kabat編號 LFR1	L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L11 L12 L13 L14 L15 L16 L17 L18 L19 L20 L21 L22 L23 Q/D S/I V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S C
kabat編號 LCDR1	L24 - L34 (X)n
kabat編號 LFR2	L35 L36 L37 L38 L39 L40 L41 L42 L43 L44 L45 L46 L47 L48 L49 W Y Q Q L P G T A P K L L I Y
kabat編號 LCDR2	L50 - L56 (X)n
kabat編號 LFR3	L57 L58 L59 L60 L61 L62 L63 L64 L65 L66 L67 L68 L69 L70 L71 L72 L73 L74 L75 L76 L77 L78 G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L
kabat編號 LFR3	L79 L80 L81 L82 L83 L84 L85 L86 L87 R S E D E A D Y Y
kabat編號 LCDR3	L88 - L97 (X)n
kabat編號 LFR4	L98 L99 L100 L101 L102 L103 L104 L105 L106 L107 L108 L109 F G G G T K L T V L G Q
VH鍵:	
kabat編號 HFR1	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H19 H20 H21 H22 E/Q V Q/E L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C
kabat編號 HFR1	H23 H24 H25 H26 H27 H28 A A S G F T
kabat編號 HCDR1	H29 - H36 (X)n
kabat編號 HFR2	H37 H38 H39 H40 H41 H42 H43 H44 H45 H46 H47 V R Q A P G K G L E W
kabat編號 HCDR2	H48 - H66 (X)n
kabat編號 HFR3	H67 H68 H69 H70 H71 H72 H73 H74 H75 H76 H77 H78 H79 H80 H81 H82 H82A H82B H82C H83 H84 H85 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E
kabat編號 HFR3	H86 H87 H88 H89 H90 H91 H92 D T A V Y Y C
kabat編號 HCDR3	H93 - H102 (X)n
kabat編號 HFR4	H103 H104 H105 H106 H107 H108 H109 H110 H111 H112 H113 W G Q G T L V T V S S

圖12

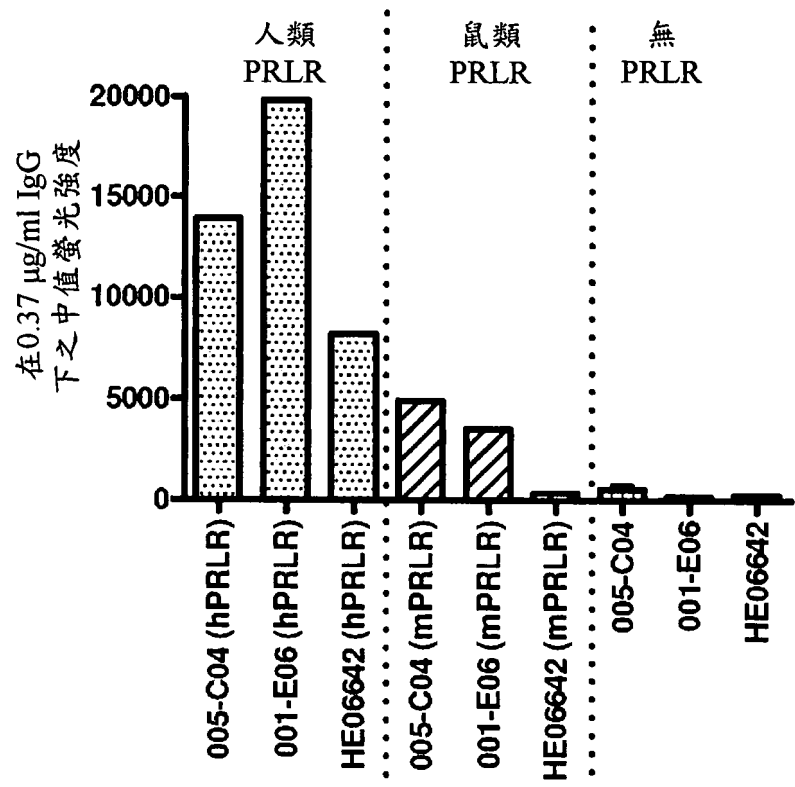
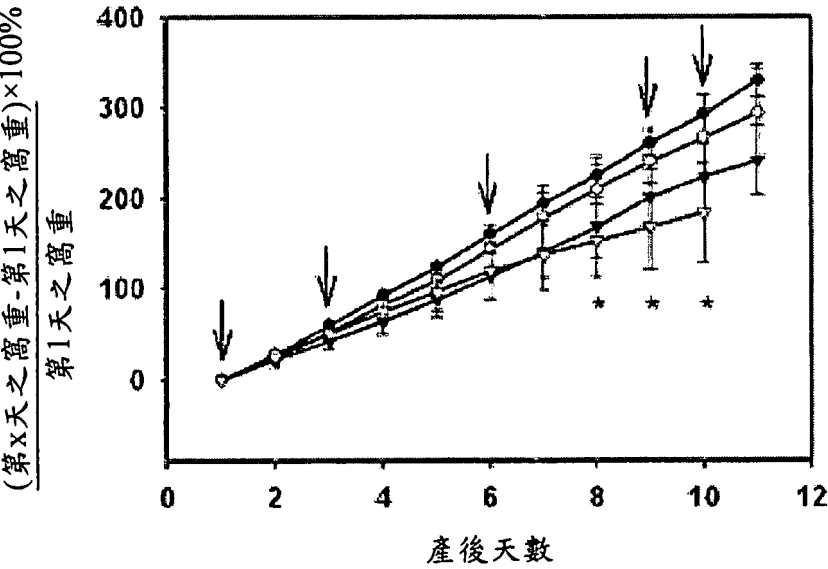


圖 13

A



B

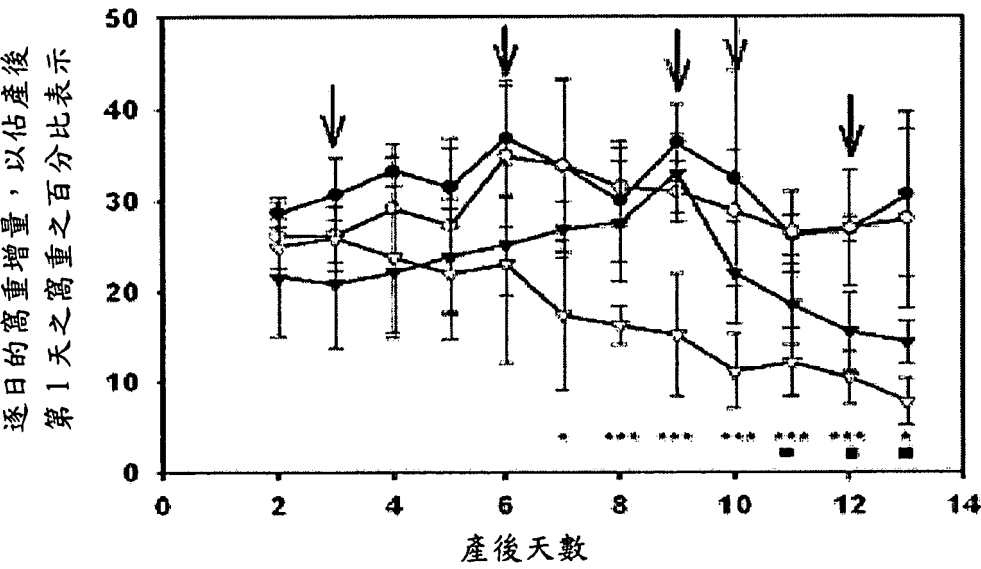


圖14

C

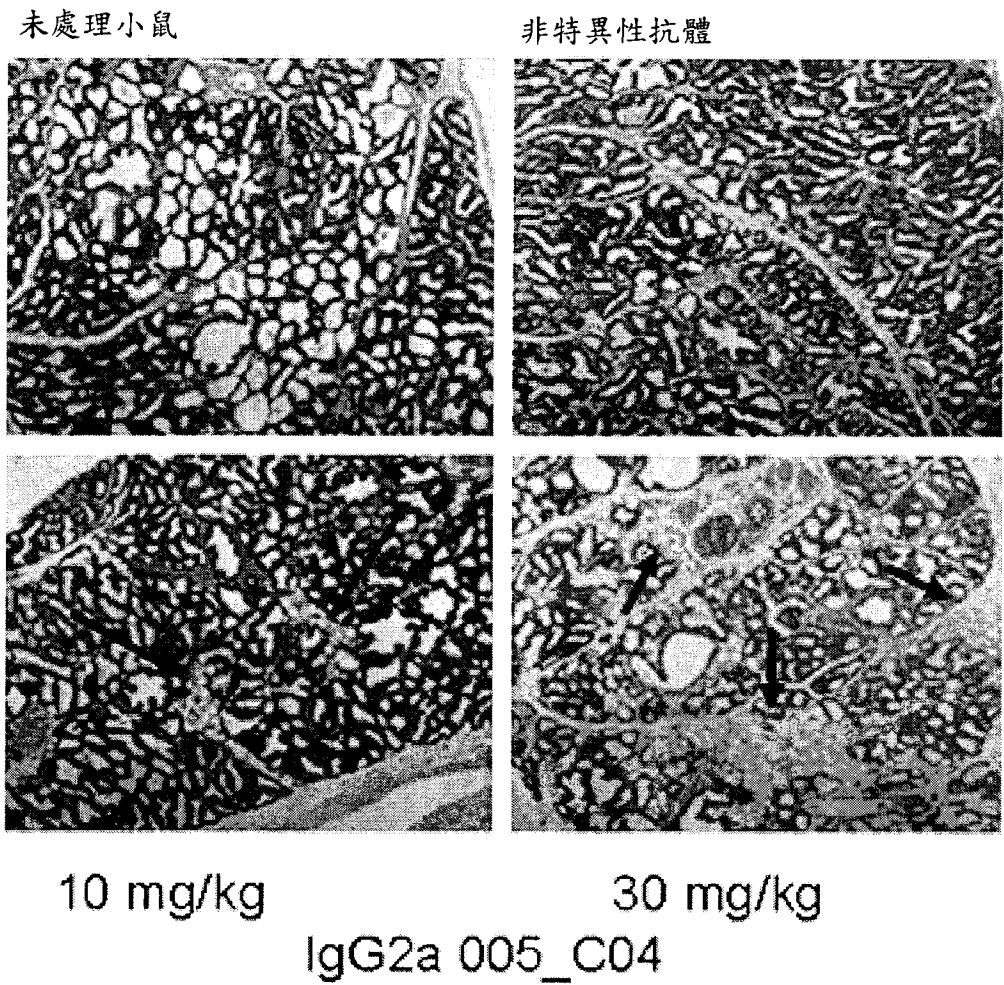


圖 14

D

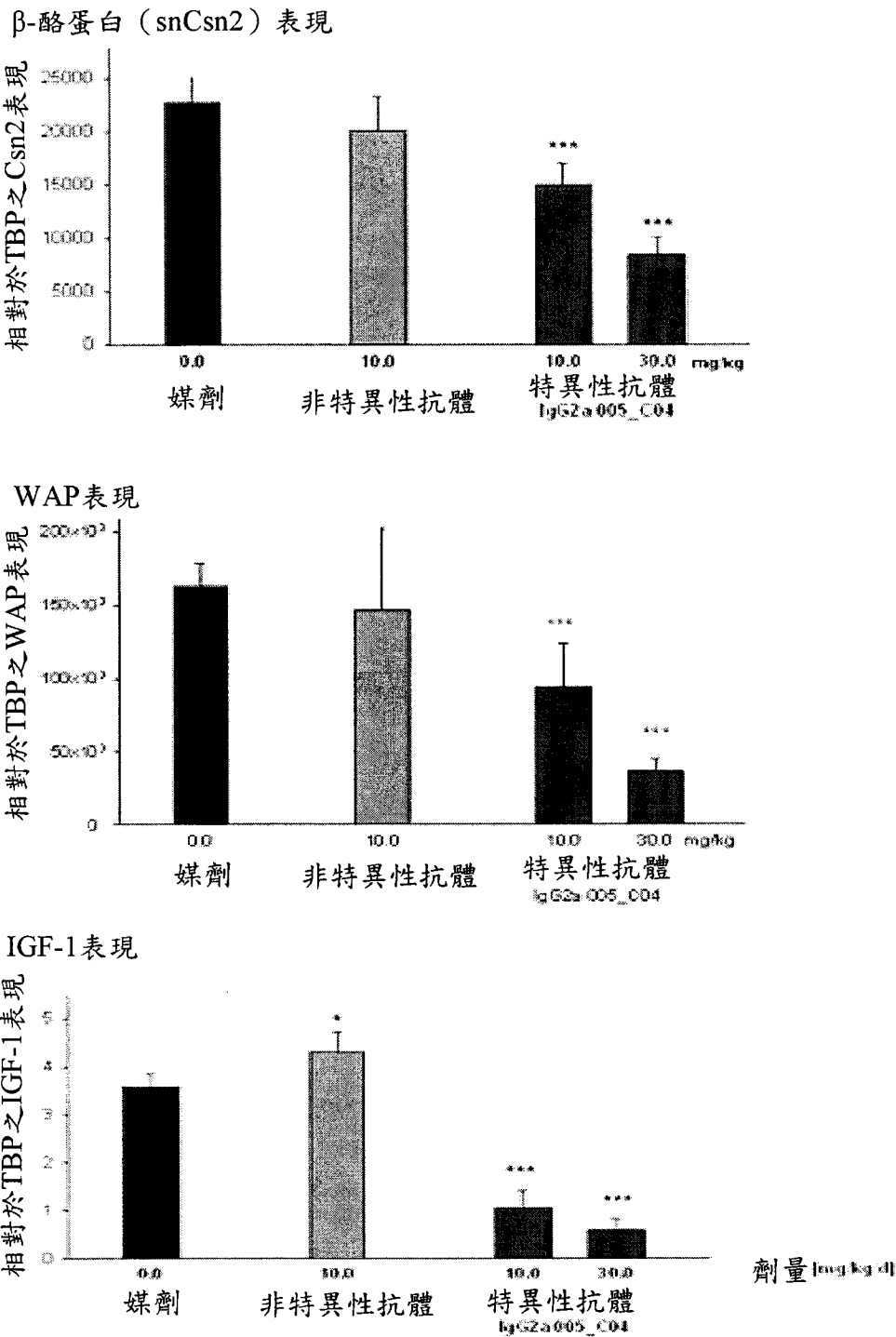


圖14

A

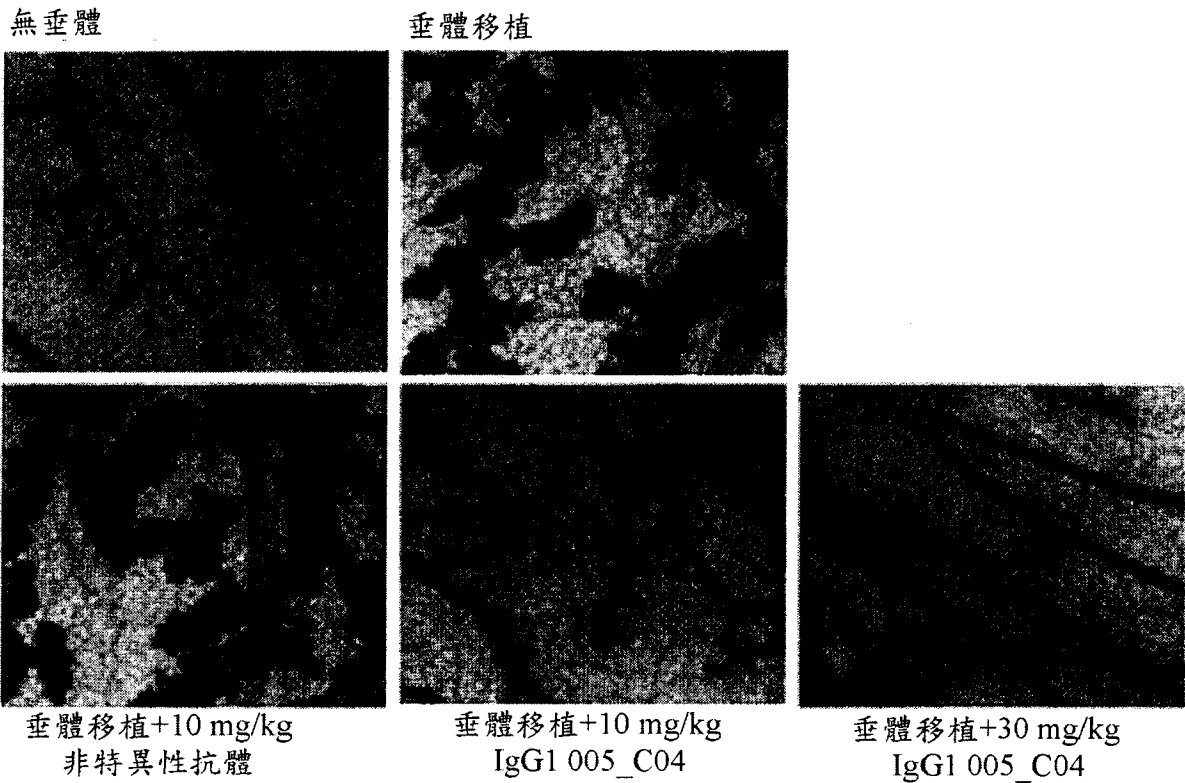


圖15

B

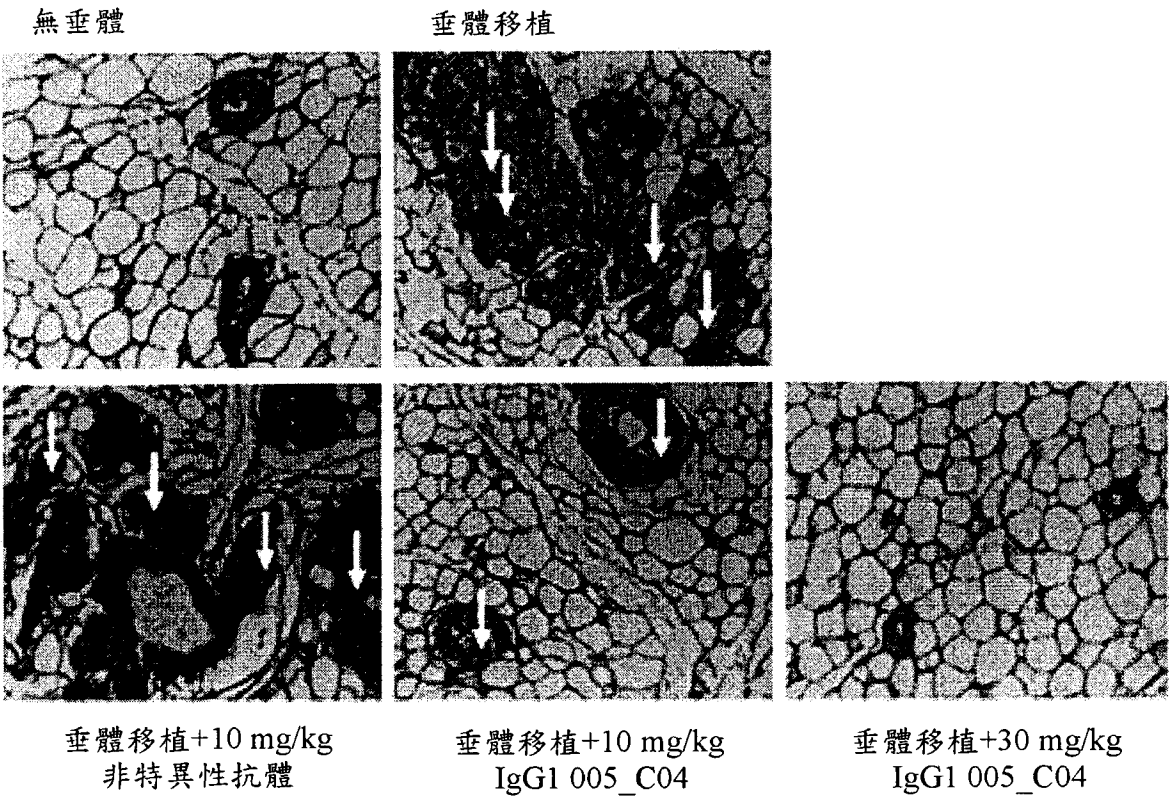


圖15

C

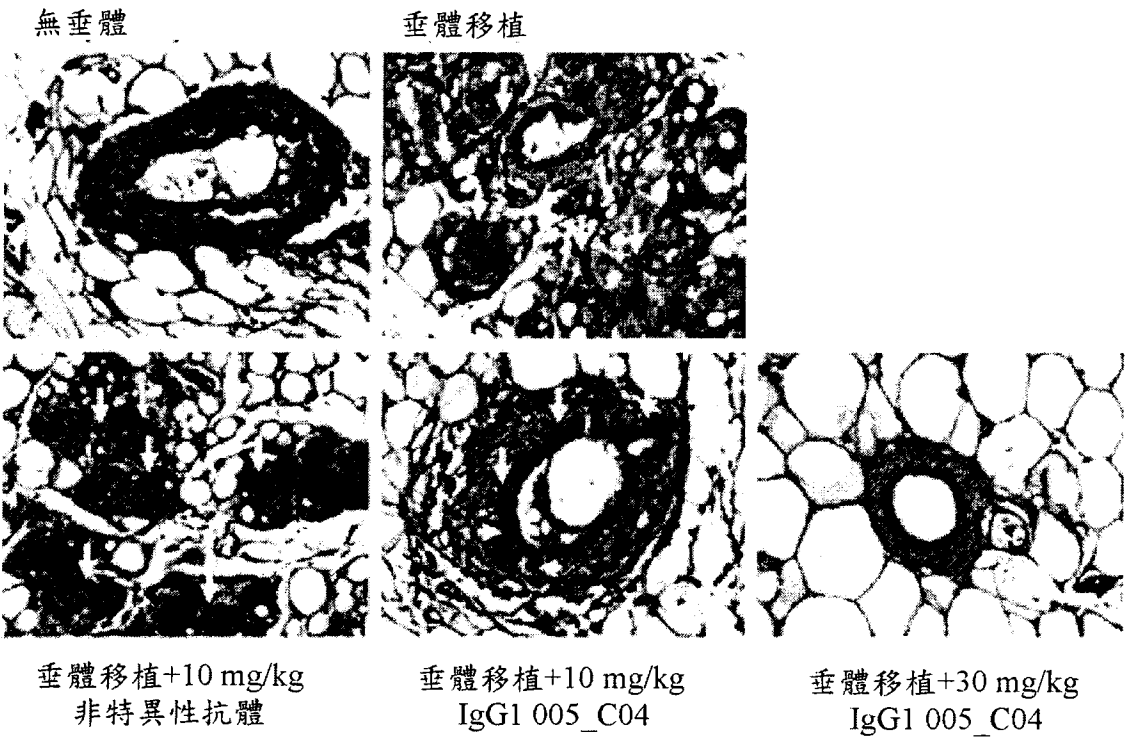


圖15

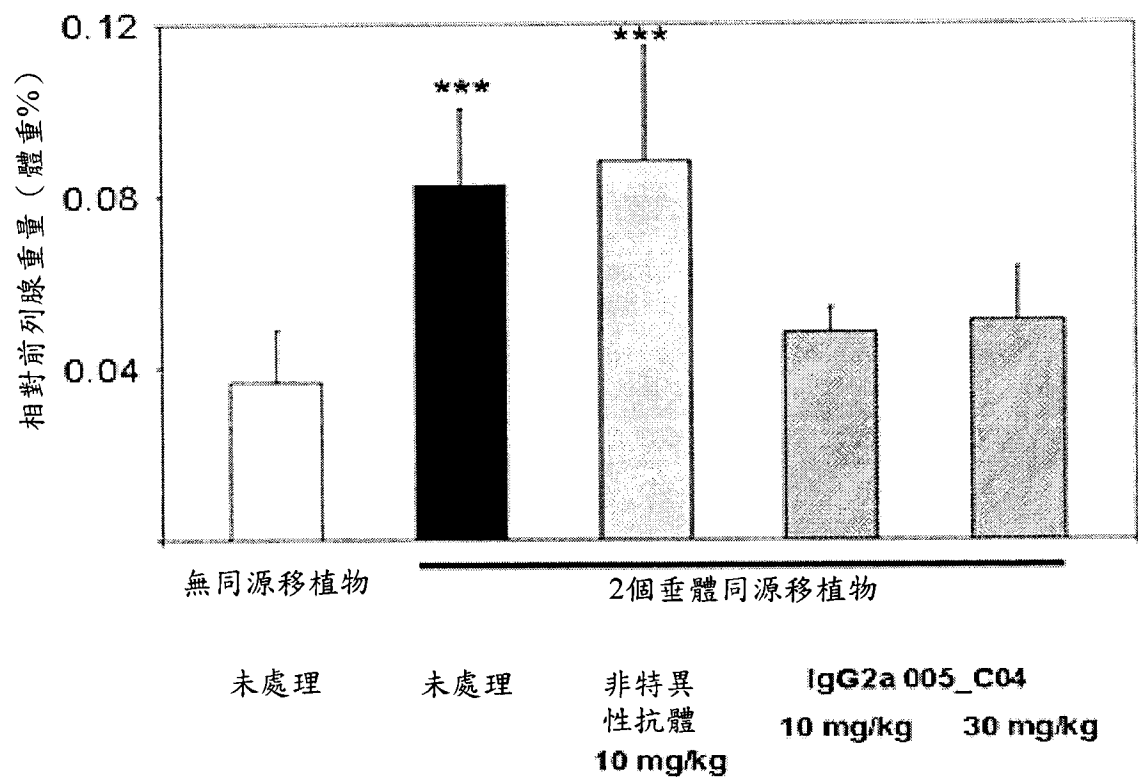


圖16



未處理 IgG2a 005_C04
30 mg/kg



非特異性抗體 IgG2a 005_C04
10 mg/kg 10 mg/kg

圖17

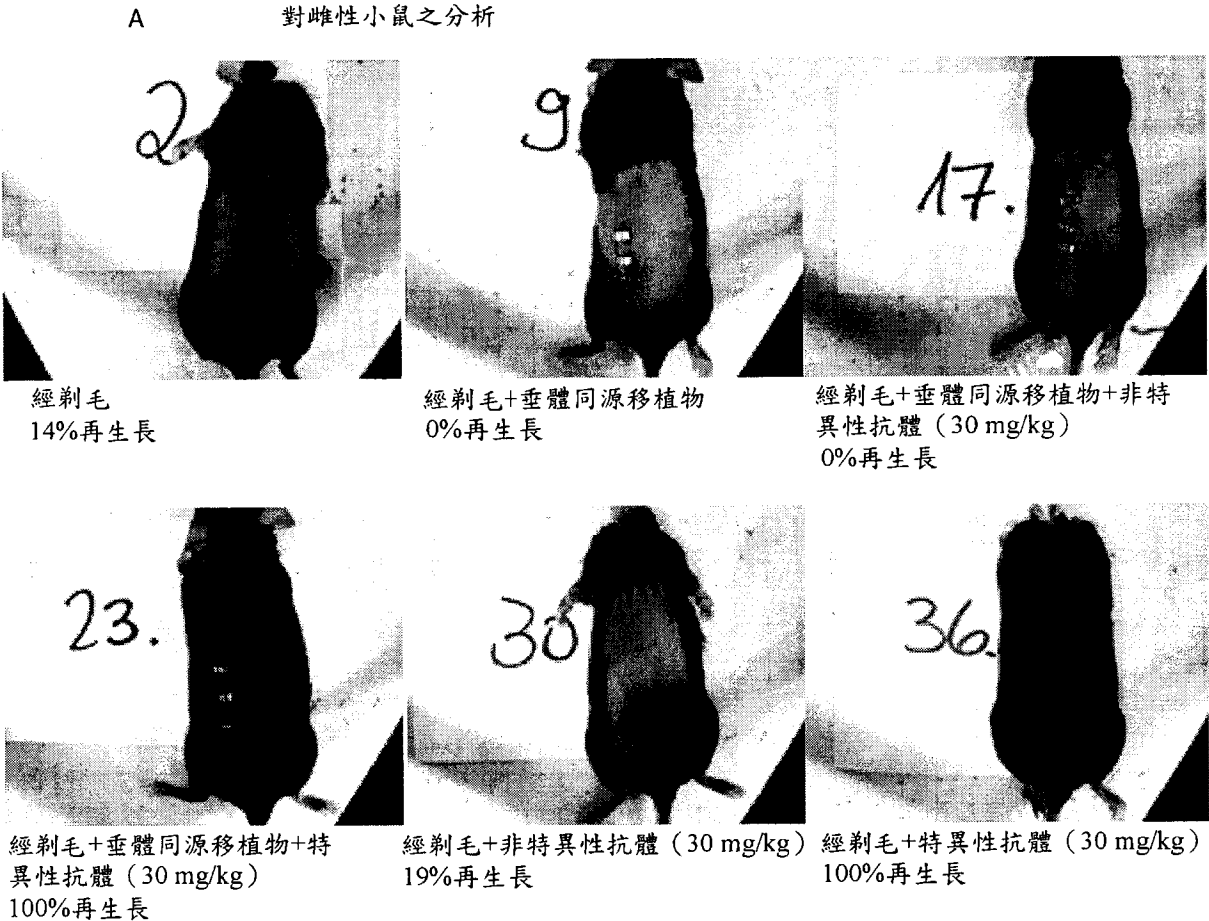


圖18

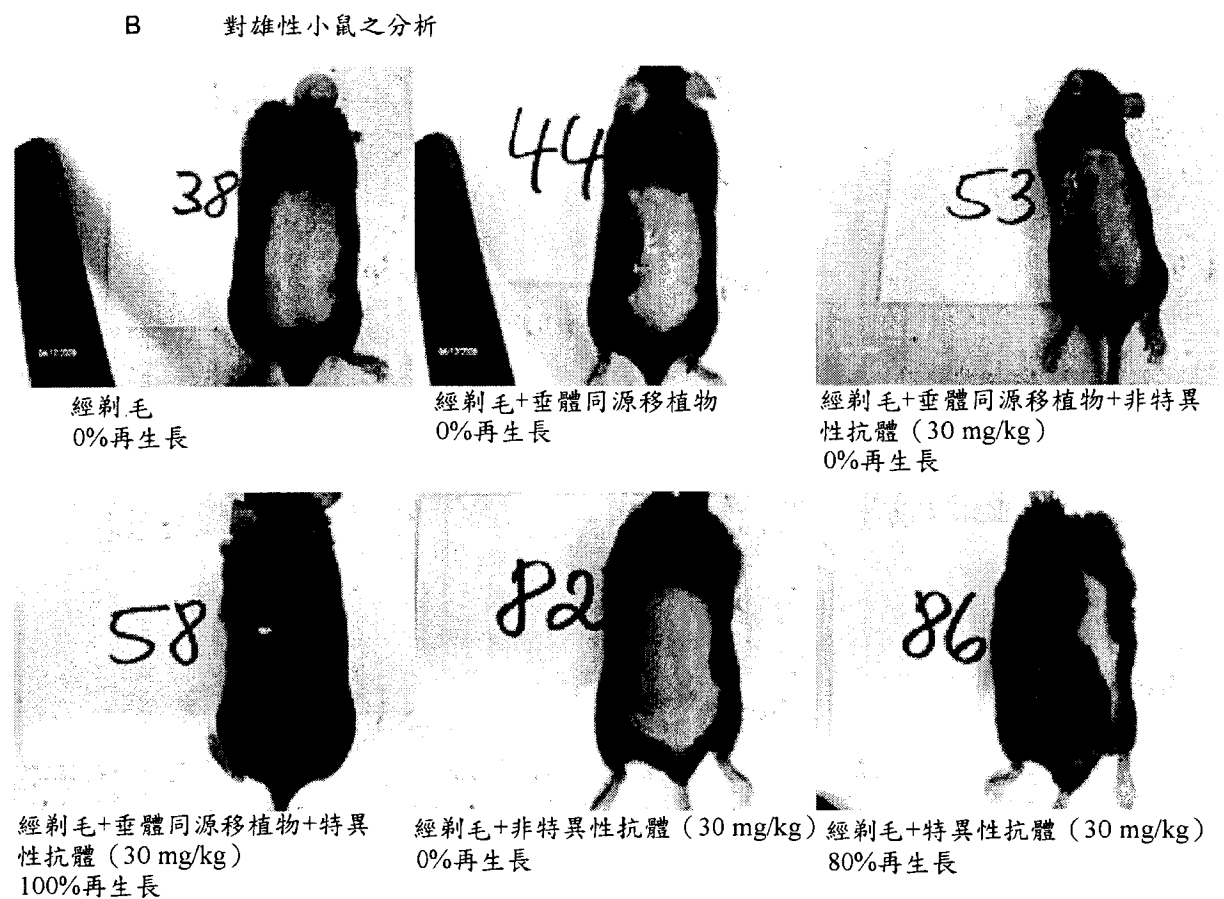
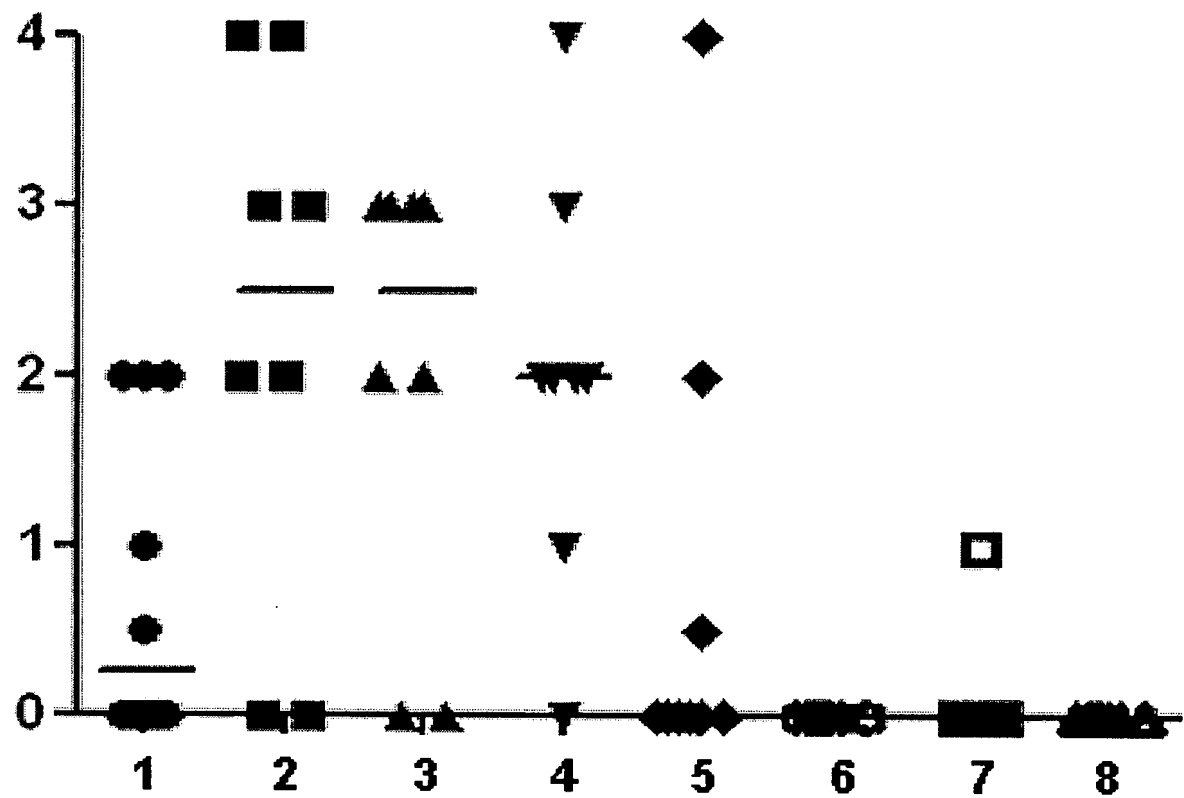


圖18



- 組1：無垂體同源移植
- 組2：垂體同源移植
- 組3：垂體同源移植+每週一次30 mg/kg非特异性抗體
- 組4：垂體同源移植+每週兩次30 mg/kg非特异性抗體
- 組5：垂體同源移植+每週一次10 mg/kg特异性抗體005_C04
- 組6：垂體同源移植+每週兩次10 mg/kg特异性抗體005_C04
- 組7：垂體同源移植+每週一次30 mg/kg特异性抗體005_C04
- 組8：垂體同源移植+每週兩次30 mg/kg特异性抗體005_C04

圖20

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)