



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I842702 B

(45) 公告日：中華民國 113 (2024) 年 05 月 21 日

(21) 申請案號：108111361

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 29 日

(51) Int. Cl. : C07K16/22 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30) 優先權：2018/03/30 美國

62/650,762

2019/03/01 美國

62/812,741

(71) 申請人：美商安進公司 (美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72) 發明人：黃 哲 HUANG, ZHE (US)；史提夫斯 珍妮特 黎安 STEVENS, JENNITTE LEANN (US)；弗林 葛洛莉 FLYNN, GREGORY (US)；福多爾 思利藍 FODOR, SZILAN (US)；達利斯 馬克 DARIS, MARK (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

WO 2009039175A2

WO 2014159579A1

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：25 項 圖式數：7 共 71 頁

(54) 名稱

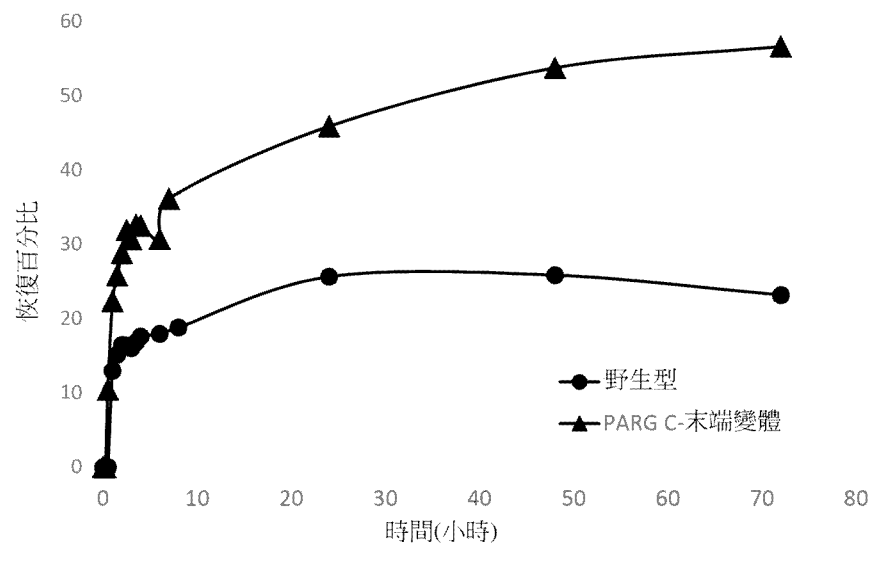
C 末端抗體變體

(57) 摘要

本發明總體上涉及具有 C 末端修飾的抗硬骨素抗體、以及包含此類抗體之組成物。

The invention generally relates to anti-sclerostin antibodies having C-terminal modifications, and compositions comprising such antibodies.

指定代表圖：



【圖5】



公告本

I842702

【發明摘要】

【中文發明名稱】

C末端抗體變體

【英文發明名稱】

C-TERMINAL ANTIBODY VARIANTS

【中文】

本發明總體上涉及具有C末端修飾的抗硬骨素抗體、以及包含此類抗體之組成物。

【英文】

The invention generally relates to anti-sclerostin antibodies having C-terminal modifications, and compositions comprising such antibodies.

【指定代表圖】

圖5

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

C末端抗體變體

【英文發明名稱】

C-TERMINAL ANTIBODY VARIANTS

【技術領域】

【0001】 本發明總體上涉及具有至少一個C末端修飾的抗硬骨素(anti-sclerostin)抗體、以及包含此類抗體之組成物。

【先前技術】

【0002】 骨礦物質含量的損失可以由多種條件引起，並可能導致嚴重的醫學問題。例如，骨質疏鬆症係人類中的使人衰弱的疾病，並且特徵在於骨骼骨質量和礦物質密度顯著下降、骨骼結構惡化(包括骨微結構的退化和骨脆性的相應增加(即，骨強度降低))、以及患病個體易骨折。儘管骨質疏鬆症被認為係由於骨量減少導致骨折的風險增加，但目前可用的骨骼障礙治療方法很少能增加成人的骨密度，並且目前大多數治療方法主要藉由抑制進一步骨再吸收而不是刺激新骨形成發揮作用。目前實行開具雌激素處方以延緩骨質流失。然而，關於患者是否獲得任何長期益處，並且雌激素是否對75歲以上的患者有任何影響存在爭議。此外，據信使用雌激素會增加患乳腺癌和子宮內膜癌的風險。對絕經後婦女還建議使用降鈣素，添加維生素K、或高劑量膳食鈣、添加或不添加維生素D的骨鈣素。然而，高劑量的鈣通常具有不希望的胃腸道副作用，並且必須連續監測血清和尿鈣水平(例如，Khosla和Riggs, *Mayo Clin. Proc.* [梅奧診所的程序] 70:978982, 1995)。目前其他治療骨質疏鬆症的方法包括二膦酸鹽(例

如，FosamaxTM、ActonelTM、BonvivaTM、ZometaTM、奧帕膦酸鹽(olpadronate)、奈立膦酸鹽(neridronate)、替魯膦酸鹽(skelid)、骨膦(bonefos)、甲狀旁腺激素、解鈣藥(calcilytic)、擬鈣劑(calcimimetic)(例如，西那卡塞)、他汀類、合成代謝類固醇、鏷和銻鹽、以及氟化鈉。然而，該等治療劑通常與不希望的副作用有關(參見Khosla和Riggs，同上)。

【0003】 硬骨素(SOST基因的產物)在硬化性骨化病(特徵在於骨骼過度生長和強密度骨的骨骼疾病)中係不存在的(Brunkow等人，Am. J. Hum. Genet. [美國人類遺傳學雜誌], 68:577-589, 2001；Balemans等人，Hum. Mol. Genet. [人類分子遺傳學], 10:537-543, 2001)。人類硬骨素的胺基酸序列由Brunkow等人(如上)報導，並且在本文中揭露為SEQ ID NO: 1。硬骨素係介導骨密度增加的有價值的靶。

【發明內容】

【0004】 在一方面，本文描述的是與SEQ ID NO: 1的硬骨素特異性結合、並且包含SEQ ID NO: 2-7中所示的六個CDR的組的抗體，其中該抗體包含重鏈，該重鏈包含在重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)。在一些實施方式中，抗體包含輕鏈可變區和重鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 9中所示的胺基酸序列，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 10中所示的胺基酸序列。在一些實施方式中，抗體包含在重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO: 11)。在一些實施方式中，抗體包含第一重鏈和第二重鏈，該第一重鏈包含在第一重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)，該第二重鏈包含野生型重鏈胺基酸序列(即，缺乏C末端Pro-Ala-Arg-

Gly)。在一些實施方式中，抗體包含SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈胺基酸序列和SEQ ID NO: 13中所示的重鏈胺基酸序列。在一些實施方式中，抗體包含在重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO: 11)。在一些實施方式中，抗體包含SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈胺基酸序列和SEQ ID NO: 14中所示的重鏈胺基酸序列。

【0005】 在一些實施方式中，抗體的重鏈之一的C末端被醯胺化(即，抗體係單醯胺化的)。在一些實施方式中，抗體的兩條重鏈的C末端被醯胺化(即，抗體係雙重醯胺化的)。

【0006】 本揭露還提供了包含本文描述的抗體的群體、和藥學上可接受的載體之藥物組成物。在一些實施方式中，藥物組成物包含與SEQ ID NO: 1的硬骨素特異性結合的抗體的混合物和藥學上可接受的載體，其中該抗體的混合物包含抗體的群體，該抗體的群體包含在重鏈的C末端具有胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)的重鏈。在一些實施方式中，組成物中約3%-5%的抗體係包含重鏈的抗體的群體，該重鏈在重鏈的C末端具有胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)。在一些方面，抗體的群體的小於70%在一條或兩條重鏈上被醯胺化。在一些方面，抗體的群體的全部或部分包含單個重鏈，該單個重鏈包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列，該單個重鏈視情況被醯胺化。在一些方面，抗體的群體的全部或部分在兩個重鏈中包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列，並且兩個重鏈視情況被醯胺化。視情況，抗體的群體的小於約35%係單醯胺化的、和/或抗體的群體的小於約35%在兩條重鏈上被醯胺化、和/或抗體的群體的小於約35%包含未被醯胺化的重鏈。在這一點上，在多個方面，抗體的群體的約33%未被醯胺化、抗體的

群體的約33%包含一條醯胺化的重鏈、並且抗體的群體的約33%包含兩條醯胺化的重鏈。

【0007】 在一些實施方式中，組成物進一步包含鈣鹽、乙酸鹽緩衝液、多元醇、和表面活性劑。在一些實施方式中，乙酸鹽包含乙酸鈣，乙酸鹽緩衝液包含乙酸鈉，多元醇包含蔗糖，並且表面活性劑包含聚山梨醇酯20。在一些實施方式中，組成物包含55 mM乙酸鹽、13 mM鈣、6.0%(w/v)蔗糖、和0.006%(w/v)聚山梨醇酯20，pH 5.2。

【0008】 本揭露還提供了增加有需要的受試者中骨礦物質密度之方法，該方法包括以有效增加受試者中骨礦物質密度的量向受試者給予本文描述的組成物。

【圖式簡單說明】

【0009】 [圖1]提供了編碼野生型洛莫索珠單抗(romosozumab)的C末端的部分之核酸序列。

【0010】 [圖2]提供了編碼洛莫索珠單抗C末端變體(PARG變體)的C末端的部分之核酸序列。

【0011】 [圖3]係顯示野生型洛莫索珠單抗(虛線)、與用Lys-C消化並藉由LC/MS肽作圖分析的洛莫索珠單抗PARG變體(實線)的放大的UV譜之疊加圖。

【0012】 [圖4]係顯示經羧肽酶處理的洛莫索珠單抗PARG變體(虛線)、與未經處理的洛莫索珠單抗PARG變體(實線)的陽離子交換(CEX)譜之疊加圖。

【0013】 [圖5]係顯示皮下注射的剪刀模型(Scissor model)的恢復百分比隨時間變化之圖。對於模擬注射部位，野生型洛莫索珠單抗(圓圈)和

PARG c末端變體洛莫索珠單抗以不同的速率擴散。

【0014】 [圖6]係顯示野生型洛莫索珠單抗與PARG C末端變體洛莫索珠單抗兩者相似地結合FcRn，並且FcRn結合不被PARG突變所影響之圖。

【0015】 [圖7]係顯示PARG C末端變體洛莫索珠單抗與FcγRIIa(131H)的相對結合遠高於野生型洛莫索珠單抗之圖。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0016】 本申請要求於2018年3月30日提交的美國臨時申請案號62/650,762和於2019年3月1日提交的美國臨時申請案號62/812,741的優先權權益，該等揭露的每者的內容藉由引用以其整體結合在此。

藉由引用結合以電子方式提交的材料

【0017】 藉由引用以其整體結合在此的是電腦可讀的核苷酸/胺基酸序列表，該核苷酸/胺基酸序列表與本文同時提交並如下定義：創建於2019年3月21日的ASCII(文本)檔案名稱「52080_SeqListing.txt」，21,006位元組。

藉由引用結合

【0018】 以下申請藉由引用以其整體結合在此：於2012年8月2日提交的國際專利公開案號PCT/US 2012/049331，其要求於2011年8月4日提交的美國臨時專利申請案號61/515,191的權益；於2006年4月25日提交的美國專利申請案號11/410,540，其要求於2006年4月17日提交的美國臨時專利申請案號60/792,645、於2006年3月13日提交的美國臨時專利申請案號60/782,244、於2006年2月24日提交的美國臨時專利申請案號

60/776,847、和於2005年5月3日提交的美國臨時專利申請案號60/677,583的權益；以及於2006年4月25日提交的美國專利申請案號11/411,003(以美國專利案號7,592,429發佈)，其要求於2006年4月17日提交的美國臨時專利申請案號60/792,645、於2006年3月13日提交的美國臨時專利申請案號60/782,244、於2006年2月24日提交的美國臨時專利申請案號60/776,847、和於2005年5月3日提交的美國臨時專利申請案號60/677,583的權益。以下申請也藉由引用結合在此：於2008年9月17日提交的美國專利申請案號12/212,327，其要求於2007年9月17日提交的美國臨時專利申請案號60/973,024的權益；以及於2010年6月29日提交的美國專利申請案號12/811,171，其係依照於2008年12月15日提交的國際專利申請案號PCT/US08/86864的35 U.S.C. § 371的美國國家階段申請，其要求於2007年12月14日提交的美國臨時專利申請案號61/013,917的權益。

【0019】 本揭露提供了與硬骨素特異性結合的抗體，其中該抗體包含重鏈，該重鏈在重鏈的C末端包含含有Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)的胺基酸序列。在一些實施方式中，抗體包含第一重鏈和第二重鏈，該第一重鏈在重鏈的C末端包含含有Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)的胺基酸序列，該第二重鏈包含野生型重鏈胺基酸序列。在一些實施方式中，抗體在重鏈的C末端包含含有Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO: 11)的胺基酸序列。還提供了包含抗體(或抗體的混合物)之藥物組成物、以及使用該抗體之方法。

【0020】 「抗硬骨素抗體」或「與硬骨素結合的抗體」係與SEQ ID NO: 1的硬骨素結合的抗體或其部分。重組人類硬骨素/SOST可從例如，R&D系統公司(R&D Systems)(明尼阿波里斯市，明尼蘇達州，美國；

2006目錄號1406-ST-025)商購。美國專利案號6,395,511和6,803,453、以及美國專利公開案號2004/0009535和2005/0106683通常是指抗硬骨素抗體。適用於本發明上下文的硬骨素抗體的實例也描述在美國專利公開案號2007/0110747和2007/0072797中，將其藉由引用結合在此。關於產生硬骨素抗體的材料和方法的其他資訊可以在美國專利公開案號20040158045(藉由引用結合在此)中找到。

【0021】 術語「抗體」係指完整的免疫球蛋白分子(包括具有全長重鏈和/或輕鏈的多株、單株、嵌合、人源化、和/或人類形式)。

【0022】 如本文所用，「特異性結合」意指抗體優先結合抗原而不是其他蛋白質。在一些實施方式中，「特異性結合」意指抗體對抗原的親和力高於對其他蛋白質的親和力。特異性結合抗原的抗體對於抗原可具有以下結合親和力：小於或等於 1×10^{-7} M、小於或等於 2×10^{-7} M、小於或等於 3×10^{-7} M、小於或等於 4×10^{-7} M、小於或等於 5×10^{-7} M、小於或等於 6×10^{-7} M、小於或等於 7×10^{-7} M、小於或等於 8×10^{-7} M、小於或等於 9×10^{-7} M、小於或等於 1×10^{-8} M、小於或等於 2×10^{-8} M、小於或等於 3×10^{-8} M、小於或等於 4×10^{-8} M、小於或等於 5×10^{-8} M、小於或等於 6×10^{-8} M、小於或等於 7×10^{-8} M、小於或等於 8×10^{-8} M、小於或等於 9×10^{-8} M、小於或等於 1×10^{-9} M、小於或等於 2×10^{-9} M、小於或等於 3×10^{-9} M、小於或等於 4×10^{-9} M、小於或等於 5×10^{-9} M、小於或等於 6×10^{-9} M、小於或等於 7×10^{-9} M、小於或等於 8×10^{-9} M、小於或等於 9×10^{-9} M、小於或等於 1×10^{-10} M、小於或等於 2×10^{-10} M、小於或等於 3×10^{-10} M、小於或等於 4×10^{-10} M、小於或等於 5×10^{-10} M、小於或等於 6×10^{-10} M、小於或等於 7×10^{-10} M、小於或等於 8×10^{-10} M、

小於或等於 9×10^{-10} M、小於或等於 1×10^{-11} M、小於或等於 2×10^{-11} M、小於或等於 3×10^{-11} M、小於或等於 4×10^{-11} M、小於或等於 5×10^{-11} M、小於或等於 6×10^{-11} M、小於或等於 7×10^{-11} M、小於或等於 8×10^{-11} M、小於或等於 9×10^{-11} M、小於或等於 1×10^{-12} M、小於或等於 2×10^{-12} M、小於或等於 3×10^{-12} M、小於或等於 4×10^{-12} M、小於或等於 5×10^{-12} M、小於或等於 6×10^{-12} M、小於或等於 7×10^{-12} M、小於或等於 8×10^{-12} M、或小於或等於 9×10^{-12} M。

【0023】 在一些或任何實施方式中，抗體與SEQ ID NO: 1的硬骨素、或其天然存在的變體以小於或等於 1×10^{-7} M、小於或等於 1×10^{-8} M、小於或等於 1×10^{-9} M、小於或等於 1×10^{-10} M、小於或等於 1×10^{-11} M、或小於或等於 1×10^{-12} M的親和力(Kd)進行結合。使用多種技術確定親和力，其中一個實例係親和力ELISA測定。在多種實施方式中，藉由BIAcore測定確定親和力。在多種實施方式中，藉由動力學方法確定親和力。在多種實施方式中，藉由平衡/溶液方法確定親和力。美國專利公開案號2007/0110747(其揭露藉由引用結合在此)含有適用於測定抗體對硬骨素的親和力(Kd)的親和力測定的其他描述。

【0024】 在一些或任何實施方式中，抗體(其抗體片段)與包含SEQ ID NO: 1中所示的胺基酸序列的硬骨素多肽結合，並且結合包含SEQ ID NO: 5的序列的硬骨素的區域(CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC；對應於SEQ ID NO: 1的胺基酸86-111)。此區域在本文中也被稱為硬骨素的「環2」區域。環2區域外的硬骨素區域在本文中定義為「非環2區域」。可替代地或此外，抗硬骨素抗體與包含SEQ ID NO: 1的胺基酸57-146的硬骨素多肽結合。可替代地或此外，抗硬骨素抗體與包含SEQ ID NO: 1

的胺基酸89-103和/或SEQ ID NO: 1的胺基酸137-151的硬骨素多肽結合。在一些或任何實施方式中，作為全長硬骨素的片段的硬骨素多肽保留了SEQ ID NO: 1的人類硬骨素的對應多肽區域的三級結構。

【0025】 在一些或任何實施方式中，本文描述的抗硬骨素抗體較佳的是在美國專利公開案號2007/0110747中描述的基於細胞的測定和/或美國專利公開案號20070110747中描述的體內測定中調節硬骨素功能、和/或與美國專利公開案號2007/0110747中描述的一個或多個表位結合、和/或交叉阻斷美國專利公開案號2007/0110747中描述的抗體之一的結合、和/或被美國專利公開案號2007/0110747中描述的抗體之一與硬骨素的結合而交叉阻斷(以其整體結合在此，以及針對用於表徵抗硬骨素抗體的測定的描述)。

【0026】 「CDR」係指在抗體可變序列內的互補決定區。對於每個可變區，在重鏈和輕鏈的每個可變區中存在三個CDR，其被稱為CDR1、CDR2和CDR3。如本文所用，術語「六個CDR的組」係指在輕鏈可變區和重鏈可變區中出現的能夠結合抗原的三個CDR的組。根據不同的系統，CDR的確切邊界已被不同地定義。由Kabat(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest [目的免疫球蛋白的序列] National Institutes of Health [國立衛生研究院]，貝塞斯達軟體公司(Bethesda)，馬里蘭州 (1987)和(1991))描述的系統不僅提供了適用於抗體的任何可變區的精確的殘基編號系統，但也提供了定義三個CDR的精確殘基邊界。該等CDR可以被稱為Kabat CDR。Chothia和同事(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. [分子生物學雜誌] 196:901-917 (1987)以及Chothia等人，Nature [自然] 342:877-883 (1989))發現Kabat CDR內的某些子部分採用幾乎相同

肽骨架構象，儘管在胺基酸序列水平上具有很大的多樣性。該等子部分被指定為L1、L2和L3或H1、H2和H3，其中「L」和「H」分別表示輕鏈區域和重鏈區域。該等區域可以稱為Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊的邊界。由Padlan(FASEB J. [美國實驗生物學會聯合會期刊] 9:133-139 (1995))和MacCallum(J Mol Biol [分子生物學雜誌] 262(5):73245 (1996))描述了定義與Kabat CDR重疊的CDR的其他邊界。其他CDR邊界定義可以不嚴格遵循上述系統之一，但將仍然會與Kabat CDR重疊，儘管根據特定殘基或殘基組或甚至整個CDR的預測或實驗結果，它們可能會被縮短或延長而不顯著影響抗原結合。本文使用的方法可以利用根據任何該等系統定義的CDR，但較佳的實施方式使用Kabat或Chothia定義的CDR。

【0027】藉由例如構建編碼目的CDR的多核苷酸來獲得CDR。例如，藉由使用聚合酶鏈反應、使用產生抗體的細胞的mRNA作為模板合成可變區來製備此類多核苷酸(參見，例如，Larrick等人，*Methods: A Companion to Methods in Enzymology* [方法：酶學方法指南], 2:106 (1991)；Courtenay-Luck，「Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies [單株抗體的遺傳操作]，」在*Monoclonal Antibodies Production [單株抗體製備]*中，*Engineering and Clinical Application* [工程及臨床應用]，Ritter等人(編)，第166頁，劍橋大學出版社(Cambridge University Press) (1995)；以及Ward等人，「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies [抗體的遺傳操作和表現]，」在*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* [單株抗體：原理與應用]，Birch等人，(編)，第137頁，威利利斯出版公司(Wiley-Liss, Inc.) (1995))。

【0028】 在多個方面，抗體包含與選自CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、和CDR-L3的CDR具有至少75%同一性(例如，至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的至少一個CDR序列，其中CDR-H1具有SEQ ID NO: 2中給出的序列，CDR-H2具有SEQ ID NO: 3中給出的序列，CDR-H3具有SEQ ID NO: 4中給出的序列，CDR-L1具有SEQ ID NO: 5中給出的序列，CDR-L2具有SEQ ID NO: 6中給出的序列，並且CDR-L3具有SEQ ID NO: 7中給出的序列。在多個方面，抗硬骨素抗體包含兩個CDR或六個CDR。

【0029】 在較佳的實施方式中，抗硬骨素抗體包含如下六個CDR的組：SEQ ID NO: 2的CDR-H1、SEQ ID NO: 3的CDR-H2、SEQ ID NO: 4的CDR-H3、SEQ ID NO: 5的CDR-L1、SEQ ID NO: 6的CDR-L2、和SEQ ID NO: 7的CDR-L3。

【0030】 在一些或任何實施方式中，抗體包含輕鏈可變區和重鏈可變區，該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 9中所示的胺基酸序列具有至少75%同一性(例如，至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的胺基酸序列，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 10中所示的胺基酸序列具有至少75%同一性(例如，至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的胺基酸序列。在多個方面，與SEQ ID NO: 9或10相比，序列的差異位於對應序列中的CDR區域之外。在一些或任何實施方式中，抗體包含輕鏈可變區和重鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 9中所示的胺基酸序列，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 10中所示的胺基酸序列。

【0031】 在一些或任何實施方式中，抗硬骨素抗體包含重鏈(例如，兩條重鏈)的全部或部分和輕鏈(例如，兩條輕鏈)的全部或部分，該重鏈

包含與SEQ ID NO: 16中所示的胺基酸序列具有至少75%同一性(例如，至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的胺基酸序列，該輕鏈包含與SEQ ID NO 12中所示的胺基酸序列具有至少75%同一性(例如，至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的胺基酸序列。

【0032】 抗體包含重鏈，該重鏈包含在重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)。在一些實施方式中，抗體的兩條重鏈的C末端包含胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)。在一些實施方式中，抗體包含第一重鏈和第二重鏈，該第一重鏈包含胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)，該第二重鏈包含野生型胺基酸序列。在多個方面，抗體包含SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈胺基酸序列和SEQ ID NO: 13中所示的重鏈胺基酸序列。

【0033】 可替代地，在一些或任何實施方式中，抗體在重鏈的C末端(視情況在兩條重鏈的C末端)包含含有Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO: 11)的胺基酸序列。在一些實施方式中，抗體包含第一重鏈和第二重鏈，該第一重鏈包含胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO: 11)，該第二重鏈包含野生型胺基酸序列(即，沒有C末端Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO: 11))。在多個方面，抗體包含SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈胺基酸序列和SEQ ID NO: 14中所示的重鏈胺基酸序列。

【0034】 其他抗硬骨素抗體的實例包括但不限於揭露於國際專利公開案號WO 2008/092894、WO 2008/115732、WO 2009/056634、WO 2009/047356、WO 2010/100200、WO 2010/100179、WO 2010/115932、和WO 2010/130830(其每個藉由引用以其整體結合在此)中的抗硬骨素抗體。

【0035】 熟悉該項技術者將理解，一些蛋白質(如抗體)可以經歷多種翻譯後修飾。該等修飾的類型和程度通常取決於用於表現蛋白質的宿主細胞系以及培養條件。此類修飾可包括糖基化、甲硫胺酸氧化、二酮哌啶形成、天冬胺酸異構化、和天冬醯胺脫醯胺的變化。頻繁的修飾係由於羧胺酶的作用而喪失羧基末端鹼性殘基(例如賴胺酸或精胺酸)(如描述在 Harris, RJ. *Journal of Chromatography* [層析學雜誌] 705:129-134, 1995 中)。

【0036】 其他修飾包括對脯胺酸和賴胺酸的羥基化、對絲胺醯或蘇胺醯殘基的羥基基團的磷酸化、對賴胺酸、精胺酸和組胺酸側鏈的 α -胺基基團的甲基化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* [蛋白質：結構和分子特性], W. H. Freeman & Co. [W.H.弗裡曼公司], San Francisco [三藩市], 第79-86頁 [1983]，藉由引用整體結合)、對N末端胺的乙醯化、和對任何C末端羧基基團的醯胺化。

【0037】 在一些或任何實施方式中，抗體(包含胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8))的重鏈的C末端被醯胺化。在一些或任何實施方式中，抗體的兩條重鏈包含胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)，並且兩條重鏈均被醯胺化。在一些實施方式中，甘胺酸被醯胺化。例如，可以如 Prigg, S. T. 等人，「New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function [對銅單加氧酶和肽醯胺化的新見解：結構、機理和功能]」, *Cell. Mol. Life Sci.* [細胞分子生命科學] 57 (2000) 1236-1259描述的發生醯胺化。酶肽基甘胺酸 α -醯胺化單加氧酶(PAM)可以催化甘胺酸的醯胺化。PAM具有兩個活性結構域，肽基甘胺酸 α -羥基化單加氧酶(PHM)和

肽基- α -羥基甘胺酸 α -醯胺化裂解酶(PAL)。PHM催化肽基甘胺酸(與抗壞血酸鹽和氧一起)轉化為肽基 α -羥基甘胺酸(與半脫氫抗壞血酸鹽(semidehydroascorbate)和水一起)。反過來，PAL催化肽基 α -羥基甘胺酸轉化為醯胺化肽(和乙醛酸)。

【0038】 可以藉由在細胞培養過程中改變某些條件來控制抗體的醯胺化。例如，銅(例如，在檸檬酸鐵銨中)和/或氧水平可用於影響醯胺化水平。預期增加銅濃度(例如，在培養基中)或氧可用性(例如，在培養期間)可藉由影響酶(如PHM)的活性來增加醯胺化。

【0039】 *藥物組成物*

【0040】 本揭露提供包含本文描述的抗體的群體與藥學上有效的稀釋劑、載體、增溶劑、乳化劑、防腐劑、和/或佐劑一起的藥物組成物。本發明的藥物組成物包括但不限於液體、冷凍和凍乾組成物。

【0041】 本揭露還提供藥物組成物，該藥物組成物包含與SEQ ID NO: 1的硬骨素特異性結合的抗體的混合物和藥學上可接受的載體，其中組成物中約3%-5%的抗體係本文描述的抗體的群體(例如，包含SEQ ID NO: 2-7中所示的六個CDR的組並具有一條重鏈(或兩條重鏈)的抗體，該重鏈包含在一條或兩條重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8))。本揭露還涵蓋組成物，該組成物包含可替代的量(例如，5%-10%、1%-3%、3%-15%、2%-10%、4%-20%、1%-5%)的本文描述的抗體的群體(例如，包含SEQ ID NO: 2-7中所示的六個CDR的組並具有一條重鏈(或兩條重鏈)的抗體，該重鏈包含在一條或兩條重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8))。

【0042】 在一些實施方式中，抗體的群體的小於70%(例如，約

69%、約68%、約67%、約66%、約65%、約64%、約63%、約62%、約61%、約60%、約59%、約58%、約57%、約56%、約55%、約54%、約53%、約52%、約51%、約50%、約49%、約48%、約47%、約46%、約45%、約44%、約43%、約42%、約41%、約40%、約39%、約38%、約37%、約36%、約35%、約34%、約33%、約32%、約31%、約30%、約29%、約28%、約27%、約26%、約25%、約24%、約23%、約22%、約21%、約20%、約19%、約18%、約17%、約16%、約15%、約14%、約13%、約12%、約11%、約10%、約9%、約8%、約7%、約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、約1%或更少)包含含有C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列的重鏈，其視情況被醯胺化。在一些實施方式中，抗體的群體的小於35%(例如、約34%、約33%、約32%、約31%、約30%、約29%、約28%、約27%、約26%、約25%、約24%、約23%、約22%、約21%、約20%、約19%、約18%、約17%、約16%、約15%、約14%、約13%、約12%、約11%、約10%、約9%、約8%、約7%、約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、約1%或更少)在兩條重鏈上包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列，其中兩條重鏈被視情況醯胺化。還預期兩條重鏈包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列，但是僅一條鏈被醯胺化。在一些實施方式中，組成物中小於35%(例如、約34%、約33%、約32%、約31%、約30%、約29%、約28%、約27%、約26%、約25%、約24%、約23%、約22%、約21%、約20%、約19%、約18%、約17%、約16%、約15%、約14%、約13%、約12%、約11%、約10%、約9%、約8%、約7%、約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、約1%或更少)的抗體包含未被醯胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序

列。在一些實施方式中，抗體的群體的約33%包含被醯胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列，抗體的群體的約33%在兩條重鏈上包含均被醯胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列，並且抗體的群體的約33%包含具有C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列的一條或兩條重鏈(但其未被醯胺化)。

【0043】 在一些實施方式中，藥物組成物含有用於修飾、維持、或保持組成物的例如，pH、滲透壓、黏度、透明度、顏色、等滲性、氣味、無菌性、穩定性、溶解或釋放速率、吸附或滲透的配製物材料。在此類實施方式中，合適的配製物材料包括但不限於胺基酸(如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸、脯胺酸、或賴胺酸)；抗微生物劑；抗氧化劑(如抗壞血酸、亞硫酸鈉、或亞硫酸氫鈉)；緩衝液(如硼酸鹽、碳酸氫鹽、Tris-HCl、檸檬酸鹽、磷酸鹽或其他有機酸)；膨脹劑(如甘露醇或甘胺酸)；螯合劑(如乙二胺四乙酸(EDTA))；錯合劑(如咖啡因、聚乙烯吡咯啶酮、 β -環糊精或 γ -環糊精)；填充劑；單糖；二糖；和其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖、或糊精)；蛋白質(如血清白蛋白、明膠、或免疫球蛋白)；著色劑、調味劑、和稀釋劑；乳化劑；親水性聚合物(如聚乙烯吡咯啶酮)；低分子量多肽；成鹽抗衡離子(如鈉)；防腐劑(氯化苄烷鎂 (benzalkonium chloride)、苯甲酸、水楊酸、硫柳汞、苯乙醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸、或過氧化氫)；溶劑(如甘油、丙二醇、或聚乙二醇)；糖醇(如甘露醇或山梨醇)；懸浮劑；表面活性劑或潤濕劑(如普朗尼克(pluronic)、PEG、脫水山梨聚糖、聚山梨醇酯(如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯)、氬核、胺丁三醇、卵磷脂、膽固醇、泰洛沙星(tyloxapal))；穩定性增強劑(如蔗糖或山梨醇)；張力增強劑

(如鹼金屬鹵化物(較佳的是氯化鈉或氯化鉀)、甘露醇、山梨醇)；遞送媒介物；稀釋劑；賦形劑和/或藥物佐劑。參見，REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES [雷明登氏藥學全書]，第18版(A. R. Genrmo編)，1990，馬克出版公司(Mack Publishing Company)。

【0044】 本文描述的特定配製物材料的選擇可以藉由例如預期的給藥途徑、遞送形式和所需劑量來驅動。參見，例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES [雷明登氏藥學全書]，同上。藥物組成物中的主要媒介物或載體可以是水性或非水性的。例如，合適的媒介物或載劑可以是注射用水、生理鹽水溶液或人造腦脊液，可能補充有用於腸胃外給予的組成物中常見的其他物質。中性緩衝鹽水或與血清白蛋白混合的鹽水係另外的示例性媒介物。在具體的實施方式中，藥物組成物包含pH約7.0-8.5的Tris緩衝液、或pH約4.0-5.5的乙酸鹽緩衝液，並且可以進一步包括山梨醇或其適合的替代物。在某些實施方式中，組成物可以藉由將具有所希望純度的選擇成分與視情況配製劑(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES [雷明登氏藥學全書]，同上)以凍乾餅或水性溶液的形式混合來製備用於儲存。此外，在一些實施方式中，可以使用合適的賦形劑(如蔗糖)將抗體或片段配製成凍乾物。

【0045】 可以選擇本發明的藥物組成物用於腸胃外遞送。可替代地，可以選擇組成物用於吸入或藉由消化道遞送，例如口服。此類藥學上可接受的組成物的製備在熟悉該項技術者的技術範圍內。配製物組分較佳的是以給藥部位可接受的濃度存在。在某些實施方式中，使用緩衝液將組成物維持在生理pH或略低的pH，通常在從約5至約8的pH範圍內。

【0046】 當考慮腸胃外給予時，用於本發明的治療組成物可以以無

熱原的、腸胃外可接受的水性溶液的形式提供，該水性溶液包含在藥學上可接受的媒介物中的所希望的抗體或片段。用於腸胃外注射的特別合適的媒介物係無菌蒸餾水，其中將抗體或片段配製成適當保存的無菌等滲溶液。在某些實施方式中，可植入藥物遞送裝置可用於引入所希望的抗體或片段。

【0047】 在一些或任何實施方式中，本文描述的藥物組成物包含鈣鹽、乙酸鹽緩衝液、多元醇、和表面活性劑。示例性鈣鹽包括但不限於乙酸鈣、碳酸鈣、和氯化鈣。在一些實施方式中，鈣鹽的濃度係至少0.5 mM、至少1 mM、至少2 mM、至少3 mM、至少4 mM、至少5 mM、至少6 mM、至少7 mM、至少8 mM、至少9 mM或至少10 mM。在某些實施方式中，鈣鹽的濃度不大於11 mM、不大於12 mM、不大於13 mM、不大於14 mM、不大於15 mM、不大於16 mM、不大於17 mM、不大於18 mM、不大於19 mM、不大於20 mM、不大於21 mM、不大於22 mM、不大於23 mM、不大於24 mM、或不大於25 mM。考慮了具有前述終點的組合的任何範圍，該範圍包括但不限於從約0.5 mM至約10 mM、約5 mM至約10 mM、或約5 mM至約15 mM。

【0048】 在一些實施方式中，藥物組成物包含具有從約0.1 mM至約1000 mM(1 M)的濃度範圍的乙酸鹽緩衝液(例如，乙酸钠)。在一些實施方式中，乙酸鹽緩衝液的濃度係至少5 mM、至少6 mM、至少7 mM、至少8 mM、至少9 mM、至少10 mM、至少15 mM、至少60 mM、至少70 mM、至少80 mM、至少90 mM、至少100 mM、至少200 mM、至少500 mM、至少700 mM、或至少900 mM。在一些實施方式中，乙酸鹽緩衝液的濃度不大於10 mM、不大於15 mM、不大於20 mM、不大於25 mM、

不大於30 mM、不大於35 mM、不大於40 mM、不大於45 mM、不大於50 mM、不大於55 mM、不大於60 mM、不大於65 mM、不大於70 mM、不大於75 mM、不大於80 mM、不大於85 mM、不大於90 mM、不大於95 mM、或不大於100 mM。考慮了具有前述終點的組合的任何範圍，該範圍包括但不限於從約5 mM至約15 mM、或從約5 mM至約10 mM或從約10 mM至約25 mM。較佳的是將緩衝液添加至pH保持在約5-6或5-5.5或4.5-5.5的濃度。在一些實施方式中，當配製物的鈣鹽係乙酸鈣時，乙酸鹽的總濃度係約10 mM至約55 mM、或約20 mM至約40 mM。

【0049】 在一些方面，藥物組成物包含總濃度為至少約10 mM、至少約15 mM、至少約20 mM、至少約25 mM、至少約30 mM、至少約35 mM、至少約40 mM、45 mM、或50 mM的乙酸鹽。在一些實施方式中，乙酸鹽的濃度不大於約30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM、55 mM、60 mM、65 mM、70 mM、75 mM、80 mM、85 mM、或90 mM。考慮了具有前述終點的組合的任何範圍，該範圍包括但不限於：約10 mM至約50 mM、約20 mM至約50 mM、約20 mM至約40 mM、約30 mM至約50 mM、或約30 mM至約75 mM。在一些實施方式中，鈣鹽係乙酸鈣，並且乙酸鹽緩衝液係乙酸钠。藉由非限制性實例的方式，含有10 mM乙酸鈣的溶液將具有20 mM乙酸鹽陰離子和10 mM的鈣陽離子(因為鈣陽離子具有二價的性質)，而含有10 mM乙酸钠的溶液將具有10 mM鈉陽離子和10 mM乙酸鹽陰離子。

【0050】 在一些實施方式中，溶液中離子(陽離子和陰離子)的總濃度係至少10 mM、至少約15 mM、至少約20 mM、至少約25 mM、至少約30 mM、至少約35 mM、至少約40 mM、至少約45 mM、至少約50

mM、至少約55 mM、至少約60 mM、至少約65 mM、至少約70 mM、至少約75 mM、至少約80 mM、或至少約85 mM。在一些實施方式中，離子的總濃度不大於約30 mM、不大於約35 mM、不大於約40 mM、不大於約45 mM、不大於約50 mM、不大於約55 mM、不大於約60 mM、不大於約65 mM、不大於約70 mM、不大於約75 mM、不大於約80 mM、不大於約85 mM、不大於約90 mM、不大於約95 mM、不大於約100 mM、不大於約110 mM、不大於約120 mM、不大於約130 mM、不大於約140 mM、不大於約150 mM、不大於約160 mM、不大於約170 mM、不大於約180 mM、不大於約190 mM、或不大於約200 mM。考慮了具有前述終點的組合的任何範圍，該範圍包括但不限於：約30 mM至約60 mM、或約30 mM至約70 mM、或約30 mM至約80 mM、或約40 mM至約150 mM、或約50 mM至約150 mM。藉由非限制性實例的方式，10 mM乙酸鈣的溶液將具有30 mM總濃度的離子(10 mM陽離子和20 mM陰離子)。

【0051】 在一些或任何實施方式中，藥物組成物包含多元醇。多元醇涵蓋一類賦形劑，其包括糖(例如甘露糖醇、蔗糖、山梨醇)和其他多元醇(例如甘油和丙二醇)。示例性多元醇包括但不限於丙二醇、甘油(丙三醇)、蘇糖、蘇糖醇、赤蘚糖、赤蘚糖醇、核糖、阿拉伯糖、阿拉伯糖醇、來蘇糖、麥芽糖醇、山梨醇、山梨糖、葡萄糖、甘露糖、甘露糖醇、左旋糖、右旋糖、麥芽糖、海藻糖、果糖、木糖醇、肌醇、半乳糖、木糖、果糖、蔗糖、1,2,6-己三醇等。高級糖包括但不限於葡聚糖、丙二醇或聚乙二醇。與非還原糖相比，還原糖，例如果糖、麥芽糖或半乳糖更容易氧化。糖醇的另外的實例係葡糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇或異麥芽酮糖。

另外的示例性凍乾保護劑包括甘油和明膠，以及蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖和水蘇糖。還原糖的實例包括葡萄糖、麥芽糖、乳糖、麥芽酮糖、異麥芽酮糖和乳果糖。非還原糖的實例包括選自糖醇和其他直鏈多元醇的多羥基化合物的非還原糖苷。單糖苷包括藉由還原二糖(例如乳糖、麥芽糖、乳果糖和麥芽酮糖)而獲得的化合物。

【0052】 在一些或任何實施方式中，藥物組成物包含濃度範圍從約0%至約40% w/v的多元醇。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為至少0.5、至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少30、或至少40% w/v的多元醇。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%至約10% w/v的多元醇。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為約2%至約6% w/v的多元醇。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為約4% w/v的多元醇。在一些或任何實施方式中，組成物包含在約6% w/v的多元醇。

【0053】 在一些或任何實施方式中，藥物組成物包含表面活性劑。示例性表面活性劑包括但不限於陰離子表面活性劑、陽離子表面活性劑、非離子表面活性劑、兩性離子表面活性劑、和兩性表面活性劑，包括衍生自天然存在的胺基酸的表面活性劑。陰離子表面活性劑包括但不限於十二烷基硫酸鈉、丁二酸二辛基磺酸鈉和二辛基磺酸鈉、鵝去氧膽酸、N-月桂醯肌胺酸鈉鹽、十二烷基硫酸鋰、1-辛烷磺酸鈉鹽、膽酸鈉水合物、去氧膽酸鈉、和甘胺去氧膽酸鈉鹽。陽離子表面活性劑包括但不限於氯化苄烷銨或苄索氯銨、氯化十六烷基吡啶一水合物和溴化十六烷基三甲銨。兩性

離子表面活性劑包括但不限於CHAPS、CHAPSO、SB3-10、和SB3-12。非離子表面活性劑包括但不限於毛地黃皂苷、曲拉通(Triton)X-100、曲拉通X-114、吐溫(TWEEN)20和吐溫80。在另一個實施方式中，表面活性劑包括但不限於聚桂醇400，硬脂酸酯聚烴氧40酯，聚氧乙烯氫化蓖麻油10、40、50和60，單硬脂酸甘油酯，聚山梨醇酯20，聚山梨醇酯40，聚山梨醇酯60，聚山梨醇酯65和聚山梨醇酯80，大豆卵磷脂和其他磷脂質(如DOPC、DMPG、DMPC、和DOPG)；蔗糖脂肪酸酯、甲基纖維素、和羧甲基纖維素。在一些或任何實施方式中，表面活性劑係聚山梨醇酯20。

【0054】 表面活性劑可以單獨或以不同比例的混合物包含在組成物中。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為約0%至約5% w/v(例如、約0.001、約0.002、約0.005、約0.007、約0.01、約0.05、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1.0、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、或約4.5% w/v)的表面活性劑。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為約0.001%至約0.5% w/v的表面活性劑。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為約0.004、約0.005、約0.007、約0.01、約0.05、或約0.1% w/v至約0.2% w/v的表面活性劑。在一些或任何實施方式中，組成物包含濃度為約0.01%至約0.1% w/v的表面活性劑。

【0055】 在一些或任何實施方式中，藥物組成物包含55 mM乙酸鹽、13 mm鈣、6.0 %(w/v)蔗糖、0.006%(w/v)聚山梨醇酯20，pH 5.2。

【0056】 另外的藥物組成物對於熟悉該項技術者將是顯而易見的，包括在持續或控制遞送配製物中涉及抗原結合蛋白的配製物。用於配製各

種其他持續或控制遞送方式的技術(諸如脂質體載劑、生物可侵蝕微粒或多孔珠粒和儲庫注射)也是熟悉該項技術者已知的。參見，例如國際專利申請案號PCT/US93/00829，其藉由引用結合在此並描述了用於遞送藥物組成物的多孔聚合物微粒的控制釋放。持續釋放製劑可以包括呈成型製品(例如膜或微膠囊)形式的半透性聚合物基質。持續釋放基質可以包括聚酯、水凝膠、聚丙交酯(如美國專利案號3773919和歐洲專利申請公開案號EP058481中所揭露，其每個藉由引用結合在此)、L-麩胺酸和 γ -L-麩胺酸乙酯的共聚物(Sidman等人，1983, *Biopolymers* [生物聚合物] 2:547-556)、聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等人，1981, *J. Biomed. Mater. Res.* [生物醫學材料研究雜誌] 15:167-277和Langer, 1982, *Chem. Tech.* [化學技術] 12:98-105)、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人，1981, 同上)或聚-D(-)-3-羥基丁酸(歐洲專利申請公開案號EP133988)。持續釋放組成物還可以包括可以藉由本領域中已知的若干種方法中的任一種製備的脂質體。參見，例如Eppstein等人，1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [美國國家科學院院刊] 82:3688-3692；歐洲專利申請案號EP036676；EP088046和EP143949，藉由引用結合。

【0057】 用於體內給予的藥物組成物典型地作為無菌製劑提供。滅菌可以藉由無菌濾膜過濾完成。當組成物凍乾時，可以在凍乾和重新配製之前或之後進行使用該方法的滅菌。用於腸胃外給予的組成物可以以凍乾形式或於溶液中儲存。通常將腸胃外組成物置入具有無菌輸液港的容器(例如具有可由皮下注射針刺穿的塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)中。

【0058】 根據本發明的多種實施方式，游離胺基酸可用於抗體或片段配製物中以作為增積劑、穩定劑和抗氧化劑以及其他標準用途。賴胺

酸、脯胺酸、絲胺酸和丙胺酸可用於穩定配製物中的蛋白質。甘胺酸可用於凍乾以確保正確的餅結構和特性。在液體配製物和凍乾配製物兩者中，精胺酸均可用於抑制蛋白質聚集。甲硫胺酸可用作抗氧化劑。

【0059】 抗體配製物的實施方式可以進一步包含一種或多種抗氧化劑。藉由保持適當水平的環境氧氣和溫度並避免暴露於光下，可以在某種程度上防止藥物配製物中蛋白質的有害氧化。也可以使用抗氧化賦形劑來防止蛋白質的氧化降解。在這方面，有用的抗氧化劑係還原劑、氧/自由基清除劑和螯合劑。用於根據本發明的治療性蛋白質配製物中的抗氧化劑較佳的是水溶性的並且在整個產品的儲存壽命內保持其活性。在這方面，EDTA係根據本發明的較佳的抗氧化劑。

【0060】 根據本發明的配製物可以包含金屬離子，該等金屬離子係蛋白質輔助因子並且是形成蛋白質配位錯合物所必需的，諸如形成某些胰島素懸浮液所必需的鋅。金屬離子也可以抑制一些降解蛋白質的過程。然而，金屬離子也催化降解蛋白質的物理和化學過程。

【0061】 鎂離子(10-120 mM)可用於抑制天冬胺酸異構化為異天冬胺酸。 Ca^{+2} 離子(高達100 mM)可以增加人去氧核糖核酸酶的穩定性。然而， Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 可以使重組人類去氧核糖核酸酶(rhDNase)不穩定。類似地， Ca^{+2} 和 Sr^{+2} 可以穩定因子VIII，它可以被 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 和 Fe^{+2} 去穩定，並且其聚集可以由 Al^{+3} 離子增加。

【0062】 抗體配製物的實施方式可以進一步包含一種或多種防腐劑。

【0063】 一旦配製了藥物組成物，可以將它作為溶液、懸浮液、凝膠、乳液、固體、晶體或作為脫水或凍乾粉末儲存在無菌小瓶中。此類配

製物可以以即用形式或以在給予前重新配製的形式(例如凍乾形式)儲存。本發明還提供了用於產生單劑量給予單元的套組(kit)。本發明的套組可各自含有具有乾燥蛋白質的第一容器和具有水性配製物的第二容器。在本發明的某些實施方式中，提供了含有單室和多室預填充注射器(例如液體注射器和凍乾注射器)的套組。

【0064】 待使用的含有抗體藥物組成物的治療有效量將取決於例如治療背景和目的。熟悉該項技術者將理解，治療的適當劑量水平將部分地取決於遞送的分子、使用抗體的一種或多種適應症、給藥途徑、以及患者的大小(體重、體表面積或器官大小)和/或狀況(年齡和一般健康狀況)。

【0065】 穩定性

【0066】 在包含抗體(或其抗原結合片段)的組成物的上下文中，如本文所用，術語「穩定性」和「穩定的」係指組成物中抗體(或其抗原結合片段)在給定的製造、製備、運輸和/或儲存條件下對聚集、降解或破碎的抗性。包含高度穩定性的抗體配製物表現出增強的可靠性和安全性，因此對臨床用途係有利的。

【0067】 視情況藉由檢查組成物中抗體的所希望的參數(例如，重鏈和/或輕鏈的聚集、降解，化學修飾等)隨時間的變化來評估組成物中的抗體穩定性。在這一點上，通常在初始時間點(T0)和評估時間點(T1)檢查參數，視情況同時將抗體暴露於多種環境條件中的任何一種，並進行比較。初始時間點可以是，例如，抗體首次在組成物中配製或首次檢查品質的時間(即，檢查以確定抗體組成物是否滿足關於聚集或降解的法規或製造規範)。初始時間點也可以是抗體在組成物中重新配製的時間(例如，與初始製劑相比，以更高或更低的濃度重新配製)。在多種實施方案中，評估時

間點係在初始時間點之後約1週(或約2週、或約3週、或約4週、或約5週、或約6週、或約7週、或約8週、或約10週、或約3個月、或約6個月、或約1年)。可在各種儲存條件下評估組成物中抗體或其片段的所希望的參數(例如，聚集或降解)，該等儲存條件如-30°C、4°C、20°C或40°C的溫度、搖動、pH、儲存在不同容器材料(例如，玻璃瓶、預填充注射器等)等。

【0068】 用於確定包含抗體的組成物中存在的聚集的程度、和/或類型、和/或大小的示例性方法包括但不限於尺寸排阻層析(SEC)、高效尺寸排阻層析(HPSEC)、靜態光散射(SLS)、傅立葉轉換紅外光譜(FTIR)、圓二色性(CD)、尿素誘導蛋白質解折疊技術、內源性色胺酸螢光、差示掃描量熱法、和1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)蛋白結合技術。可以進行尺寸排阻層析(SEC)以基於它們的尺寸分離分子，藉由使分子通過填充有適當樹脂的柱，較大分子(例如聚集)將在較小分子(例如單體)之前洗脫。通常藉由在280 nm處的UV吸光度檢測分子，並且可以收集分子用於進一步表徵。高壓液相層析柱通常用於SEC分析(HP-SEC)。可替代地，可以使用分析超離心(AUC)。AUC係確定液體樣品中大分子沈降係數的正交技術。與SEC一樣，AUC能夠從單體中分離和檢測抗體片段/聚集體，並且進一步能夠提供有關分子量的資訊。組成物中的抗體聚集也可以藉由使用庫爾特計數器的粒子計數器分析、或藉由使用濁度計的濁度測量來表徵。濁度係溶液中的顆粒散射光的量的量度，因此可以用作蛋白質聚集的一般指標。另外，非還原性聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)或毛細管凝膠電泳(CGE)可用於表徵組成物中抗體或抗體片段的聚集和/或片段化狀態。

【0069】 用於確定抗體降解的示例性方法包括但不限於尺寸排阻層

析(SEC)、十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)和伴SDS的毛細管電泳(CE-SDS)、和伴線上MS檢測的反相HPLC。

【0070】 在多種實施方式中，組成物中小於5%的本文描述的抗體在感興趣的條件下是聚集形式。例如，在-30°C、4°C、20°C或40°C儲存約1週(或約2週、或約3週、或約4週、或約5週、或約6週、或約7週、或約8週、或約10週、或約3個月、或約6個月或約1年)的時間後，組成物中的小於4%、或小於3%、或小於2%、或小於1%的抗體係聚集形式。在一些實施方式中，在約4°C儲存兩週後，組成物中小於5%(或小於4%、或小於3%、或小於2%、或小於1%、或更少)的本文描述的抗體係聚集形式。

【0071】 例如，在-30°C、4°C、20°C或40°C儲存約1週(或約2週、或約3週、或約4週、或約5週、或約6週、或約7週、或約8週、或約10週、或約3個月、或約6個月、或約1年)的時間後，組成物中的至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%)的抗體視情況以非聚集的形式(即，單體)存在。在一些實施方式中，在約4°C儲存兩週後，至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或更多)的抗體在組成物中以非聚集形式存在。在一些實施方式中，在約4°C儲存兩週持續兩週後，至少99%的抗體在組成物中以非聚集形式存在，和/或在40°C儲存兩週後，至少95%的抗體在組成物中以非聚集形式存在。

【0072】 在多種實施方式中，組成物中小於5%的本文描述的抗體係降解的。例如，組成物中小於4%、或小於3%、或小於2%、或小於1%或

更少的抗體在感興趣的條件下降解。例如，視情況儲存在約-30°C、約4°C、約20°C或約40°C持續約1週(或約2週、或約3週、或約4週、或約5週、或約6週、或約7週、或約8週、或約10週、或約3個月、或約6個月或約1年)的時間的組成物中的至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%)的抗體係完整的(即，未降解的)。在一些方面，將組成物在約4°C儲存兩週的時間後，至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或更多)的抗體係完整的(即非降解的)。在一些實施方式中，當在組成物在約4°C儲存兩週時至少99%的抗體保持完整，和/或當在組成物在約40°C儲存兩週時至少95%保持完整。

【0073】 本文還考慮了組成物中抗體的功能或活性穩定性。用於檢測和/或定量例如抗體與靶的結合、或硬骨素中和的測定法係本領域已知的。視情況，與在初始時間點的抗體活性相比，抗體在感興趣的條件下表現出約50%-100%的活性。例如，與初始時間點的活性相比，抗體保持約60%-90%或70%-80%之間的活性水平。因此，抗體的功能穩定性包括至少約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的活性保留，並且可包括與初始時間點的活性相比，活性測量值大於100%，如105%、110%、115%、120%、125%或150%或更多。

【0074】 黏度

【0075】 在一些實施方式中，確定包含一種或多種本文描述的抗體的組成物的黏度。如本文所用，術語「黏度」係指「絕對黏度」。絕對黏

度(有時稱為動態或簡單黏度)係運動黏度和流體密度的乘積(絕對黏度 = 運動黏度 x 密度)。運動黏度的尺寸為 L^2/T ，其中L係長度並且T係時間。通常，運動黏度以厘司(cSt)表示。運動黏度的SI單位係 mm^2/s ，其係1 cSt。絕對黏度以厘泊(cP)的單位表示。絕對黏度的SI單位係毫帕-秒(mPa-s)，其中1 cP = 1 mPa-s。

【0076】 組成物的黏度可以在向組成物中添加抗體後數小時(例如，1-23小時)、數天(例如，1-10天)、數週(例如，1-5週)、數月(例如，1-12個月)、或數年(例如，1-2年、1-3年)測量。黏度測量可以在儲存或給藥溫度(例如 $2^{\circ}C$ - $8^{\circ}C$ 或 $25^{\circ}C$ (室溫))進行。在一些實施方式中，液體或重新配製的液體組成物在儲存和/或給藥溫度的絕對黏度為15 cP或更低，或14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、或4 cP或更低。在一些實施方式中，液體或重新配製的液體組成物的絕對黏度為6 cP或更低。

【0077】 在一些實施方式中，在添加抗體之前和之後測量抗體組成物的黏度。測量黏度的方法係本領域公知的，該等方法包括例如使用毛細管黏度計、或錐板流變儀。可以使用任何方法，其條件係使用相同的方法來比較測試和參考配製物。

【0078】 治療方法

【0079】 本文描述的抗體和藥物組成物可用於治療或預防骨相關障礙，如與異常成骨細胞或破骨細胞活性相關的骨相關障礙。在一些實施方式中，將抗體給予至經受選自下組的骨相關疾病的受試者，該組由以下組成：軟骨發育不全、顱鎖骨發育不全、內生軟骨瘤病、纖維性結構不良、高歇氏病(Gaucher's Disease)、低血磷性佝僂病、馬方氏綜合症、遺傳多發性外生骨疣、多發性神經纖維瘤、成骨不全症、骨硬化病、骨斑點症、

硬化病變、假關節、化膿性骨髓炎、牙周病、抗癲癇藥物引起的骨質流失、原發性和繼發性甲狀旁腺功能亢進、家族性甲狀旁腺功能亢進症狀、失重導致骨質流失、男性骨質疏鬆症、絕經後骨質流失、骨關節炎、骨關節炎、骨浸潤性疾病、口腔骨流失、顎骨壞死、幼年佩吉特氏病(juvenile Paget's disease)、蠟淚樣骨病、代謝性骨病、肥大細胞增多症、鎌狀細胞性貧血/疾病、器官移植導致的骨質流失、腎移植引起的骨質流失、全身性紅斑狼瘡、強直性脊柱炎、癲癇、幼年特發性關節炎、地中海貧血、黏多醣貯積症、法布裡病(Fabry Disease)、特納綜合症、唐氏綜合症、克蘭費爾特綜合症(Klinefelter Syndrome)、麻瘋病、皮瑟氏疾病(Perthe's Disease)、青少年特發性脊柱側凸、嬰兒發作多系統炎症性疾病、溫徹斯特綜合症(Winchester Syndrome)、門克斯病(Menkes Disease)、威爾遜氏病(Wilson's Disease)、骨缺血性疾病(如累格氏病(Legg-Calve-Perthes disease)和地區遷徙的骨質疏鬆症)、低迷的狀態、類固醇引起的病症、激素性骨質流失、肝素誘導的骨質流失、骨髓障礙、壞血病、營養失調、鈣缺乏、骨質疏鬆症、骨量減少、酗酒、慢性肝病、絕經後狀態、慢性炎症病症、類風濕性關節炎、炎症性腸病、潰瘍性結腸炎、炎症性結腸炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、月經過少、閉經、懷孕相關的骨質流失、糖尿病、甲狀腺機能亢進、甲狀腺失調、甲狀旁腺能失調、庫興氏病(Cushing's disease)、肢端肥大症、生殖官能不良、固定術或廢用(immobilization or disuse)、反射性交感神經營養不良綜合症、局部骨質疏鬆症、骨軟化、與關節替換相關的骨質流失、HIV相關的骨質流失、與生長激素有光的骨質流失、囊胞性纖維症有關的骨質流失、化學療法相關的骨質流失、腫瘤誘導的骨質流失、癌症相關的骨質流失、激素相關的骨

質流失、多發性骨髓瘤、藥物誘導的骨質流失、神經性食欲缺乏、疾病相關的面部骨質流失、疾病相關的顱骨骨質流失、疾病有關的頷骨骨質流失、疾病相關的頭骨骨質流失、隨著年齡的骨質流失、隨著年齡的面部骨質流失、隨著年齡的頭骨骨質流失、隨著年齡的頷骨骨質流失、隨著年齡的頭骨骨質流失、以及與太空旅行有關的骨質流失。

【0080】 在一些實施方式中，本文描述的抗體可用於改善整形外科手術、牙科手術、植入手術、關節替換、骨移植、骨整形手術和骨修復(如骨折癒合、骨不連癒合、延遲癒合治癒和面部重建)的結果。可在手術、替換、移植、外科手術或修復之前、期間和/或之後給予包含一種或多種抗體的組成物。

【0081】 在一些實施方式中，本文描述的抗體可用於治療任何骨折，該骨折包含兩段骨之間間隙(例如，兩段骨之間間隙為至少約1 mm)。在一些或任何實施方式中，間隙係至少約2 mm、至少約3 mm、至少約4 mm、至少約5 mm、至少約6 mm、至少約7 mm、至少約8 mm、至少約9 mm、或至少約1 cm或更大。在一些或任何實施方式中，間隙係約5 mm至1 cm、或高達1 cm。術語「骨間隙缺損」和「節段骨骼缺損」在本文中同義使用，並且是指兩個骨段之間間隙(例如，至少1 mm的間隙)。

【0082】 示例性骨間隙缺損包括但不限於粉碎性骨折、非癒合性骨折、節段性骨骼缺損、手術創建的骨缺損、手術治療的骨缺損、以及由骨或疾病的創傷性損傷產生的骨缺損(包括但不限於關節炎、腫瘤去除(切除)、或感染去除)。在一些或任何實施方式中，藉由去除感染的骨切片或由於骨癌而從骨中去除癌症產生骨間隙缺損，該骨癌包括但不限於骨肉

瘤、尤文氏肉瘤、軟骨肉瘤、惡性纖維組織細胞瘤、纖維肉瘤、和脊索瘤。在一些或任何實施方式中，骨間隙缺損係發育畸形，例如，由於遺傳缺損。

【0083】 在一些或任何實施方式中，藉由去除含有良性腫瘤的骨切片產生骨間隙缺損。示例性良性骨腫瘤包括但不限於骨瘤、骨樣骨瘤、成骨細胞瘤、骨軟骨瘤、內生軟骨瘤、軟骨黏液樣纖維瘤、動脈瘤樣骨囊腫、單房性骨囊腫、骨纖維異常增生、和骨巨細胞腫瘤。

【0084】 給予抗體增強或加速骨間隙缺損癒合，從而「治療」骨間隙缺損。「增強」骨癒合意指介導超過(即，大於)以下的骨癒合水平：未給予硬骨素抑制劑的受試者(例如，哺乳動物，例如人，即，對照受試者)中經歷的骨癒合水平。骨癒合可藉由以下來證明：例如橋接狀態、改善的骨量、改善的骨礦物質含量、和骨折間隙內的密度(即橋接骨的形成)、成熟的骨痂、改善的骨強度(視情況伴隨醫學上可接受的骨硬度水平)、或改善的受影響區域的患者使用。「改善的」意指測量參數的增加或減少(根據需要)。該增加可以是測量參數全部或部分返回至基線水平(例如，骨間隙缺損之前的水平)、返回至本領域中使用的標準數據庫中提供的值、或返回至對側功能水平(例如，全部或部分地返回至例如對側肢體的功能性性能)。在一些情況下，增加可以是超出基線水平的改善。如果需要，可以將給予一種或多種劑量的抗體的患者中的測量參數與未給予抗體的骨折患者中的相同參數(視情況年齡和性別匹配)進行比較，以進一步分析本文描述的方法的功效。

【0085】 可以使用射線照相術(例如，射線照相吸光度法)、單能量和/或雙能量X射線吸收測量法、定量電腦斷層掃描(QCT)、超音波檢查、

射線照相術(例如，射線照相吸光度測定法)、和磁共振成像來測量骨缺損部位的橋接骨、骨礦物質含量、和骨密度、和/或成熟骨癒的形成。在一些實施方式中，可以將抗體以將橋接骨形成、骨癒形成、或骨缺損部位的骨密度(或體積)有效增加至少約5%(約6%、約7%、約8%、或約9%)的劑量給予一段時間。在一些實施方式中，橋接骨形成、骨癒形成、或骨缺損部位的骨密度增加了至少約10%(例如，至少約10%、至少約12%、至少約15%、至少約18%、至少約20%、或至少約22%)。在其他實施方式中，由硬骨素抑制劑將橋接骨形成、骨癒形成、或骨缺損部位的骨密度增加至少約25%(例如，至少約26%、或至少約28%)。在還其他實施方式中，橋接骨形成、骨癒形成、或骨缺損部位的骨密度增加至少約30%(例如，至少約32%、至少約35%、至少約38%、或至少約40%)、或至少約50%(例如，至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%、或約100%)。可以在初始給予抗體後1週、2週、3週、或4週確定橋接骨形成的增加或重建。可替代地，可以在治療期結束後(例如，治療期結束後1週、2週、3週、或4週)確定骨密度水平。在一方面，與未接受抗體的年齡和性別匹配的患者相比，該方法減少了建立所希望的水準的骨形成、骨量、骨癒或骨密度(例如，本文描述的骨形成、骨礦物質密度、骨癒或骨量的任何增加百分比)所需的時間量，該方法由此減少受試者的恢復時間。例如，在一個實施方式中，抗體將增加缺損部位的骨密度或體積所需的時間的量減少至少約10%(例如，至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、或至少約50%)。

【0086】 抗體不需要治癒受試者的障礙或完全預防骨相關障礙的發作以實現有益的生物反應。可以將抗體預防性使用，意指全部或部分保護

免於骨相關障礙或其症狀。抗體還可以在治療上用於全部或部分改善骨相關障礙或其症狀，或者全部或部分地保護骨相關障礙或其症狀的進一步發展。實際上，本發明的材料和方法特別適用於增加骨礦物質密度，並且視情況在一段時間內保持增加的骨礦物質密度。

【0087】 在一些實施方式中，在例如約1週至約18個月(例如，約1個月至約12個月、約1個月至約9個月、或約1個月至約6個月、或約1個月至約3個月)的治療期進行本文描述的抗體一次或多次給予。在一些實施方式中，向受試者給予一種或多種劑量的本文描述的抗體持續例如約1月至約12月(52週)(例如，約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、或約11個月)的治療期。

【0088】 另外，取決於針對特定受試者選擇的治療方案，給予多劑量的抗體或間隔開給藥劑量可以是有利的。在一些實施方式中，在一年(12個月、52週)或更少(例如，9個月或更少、6個月或更少、或3個月或更少)的時間段定期給予抗體或其片段。在這一點上，將抗體或其片段以每約3天、或約7天、或2週、或3週、或4週、或5週、或6週、或7週、或8週、或9週、或10週、或11週、或12週、或13週、或14週、或15週、或16週、或17週、或18週、或19週、或20週、或21週、或22週、或23週、或6月、或12月一次給予至人類。

【0089】 在一些實施方式中，以有效增加骨礦物質密度或治療與骨礦物質密度降低相關的骨障礙的量和持續時間給予一種或多種劑量的抗體。在多種實施方式中，每週向受試者(例如，人類受試者)給予包含從約50毫克至約1,000毫克的抗體的一個或多個劑量。例如，抗體的劑量可以包含至少約5 mg、15 mg、25 mg、50 mg、約60 mg、約70 mg、約80

mg、約90 mg、約100 mg、約120 mg、約150 mg、約200 mg、約210 mg、約240 mg、約250 mg、約280 mg、約300 mg、約350 mg、約400 mg、約420 mg、約450 mg、約500 mg、約550 mg、約600 mg、約650 mg、約700 mg、約750 mg、約800 mg、約850 mg、約900 mg、約950 mg或高達約1,000 mg的抗體。還考慮了在任何與所有該等重點之間的範圍，例如約50 mg至約80 mg、約70 mg至約140 mg、約70 mg至約270 mg、約75 mg至約100 mg、約100 mg至約150 mg、約140 mg至約210 mg、或約150 mg至約200 mg、或約180 mg至約270 mg、或約280至約410 mg。劑量以任何間隔給予，例如每週多次(例如，每週兩次或三次)、每週一次、每兩週一次、每三週一次、或每四週一次。在一些或任何實施方式中，每週兩次給予約120 mg至約210 mg的抗體的劑量。在一些或任何實施方式中，每週兩次給予約140 mg抗體的劑量。在多個方面，每月一次給予約210 mg抗體的劑量。

【0090】 在一些實施方式中，一種或多種劑量的抗體可以包含在約0.1至約50毫克之間(例如，在約5與約50毫克之間)、或約1至約100毫克的抗體/千克體重(mg/kg)。例如、抗體的劑量可以包含至少約0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg、約10 mg/kg、約20 mg/kg、約25 mg/kg、約26 mg/kg、約27 mg/kg、約28 mg/kg、約29 mg/kg、約30 mg/kg、約31 mg/kg、約32 mg/kg、約33 mg/kg、約34 mg/kg、約35 mg/kg、約36 mg/kg、約37 mg/kg、約38 mg/kg、約39 mg/kg、約40 mg/kg、約41 mg/kg、約42 mg/kg、約43 mg/kg、約44 mg/kg、約45 mg/kg、約46 mg/kg、約47 mg/kg、約48 mg/kg、或約49

mg/kg、或約50 mg/kg、約55 mg/kg、約60 mg/kg、約65 mg/kg、約70 mg/kg、約75 mg/kg、約80 mg/kg、約85 mg/kg、約90 mg/kg、約95 mg/kg、或高達約100 mg/kg。還考慮了任何與所有該等終點之間的範圍，例如約1 mg/kg至約3 mg/kg、約1 mg/kg至約5 mg/kg、約1 mg/kg至約8 mg/kg、約3 mg/kg至約8 mg/kg、約1 mg/kg至約10 mg/kg、約1 mg/kg至約20 mg/kg、約1 mg/kg至約40 mg/kg、約5 mg/kg至約30 mg/kg、或約5 mg/kg至約20 mg/kg。

【0091】 監測療法

【0092】 可以使用單能量和雙能量X射線吸收測量法、超音波、電腦斷層掃描、射線照相術、和磁共振成像來測量抗體介導的骨礦物質含量、或骨密度的增加。骨量的量也可以藉由體重或藉由使用其他方法計算(參見, Guinness-Hey, *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* [代謝性骨病及相關研究], 5:177-181 (1984))。將動物模型用於本領域中用於測試藥物組成物和方法對例如骨損失、骨吸收、骨形成、骨強度、或骨礦化的參數的影響, 該等動物模型模擬人類疾病的條件, 如骨質疏鬆症和骨質減少。此類模型的實例包括卵巢切除的大鼠模型(Kalu, *Bone and Mineral* [骨和礦物質], 15:175-192 (1991); Frost和Jee, *Bone and Mineral* [骨和礦物質], 18:227-236 (1992); 以及Jee和Yao, *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* [神經元相互作用雜誌], 1:193-207 (2001))。本文描述的測量抗體活性的方法也可用於確定其他硬骨素抑制劑的功效。

【0093】 在人類中, 骨礦物質密度可以使用例如髌部和脊柱的雙X射線吸收測定法(DXA)在臨床上確定。其他技術包括定量電腦斷層掃描(QCT)、超音波檢查、單能X射線吸收測定(SXA)、和射線照相吸光測

定。用於測量的常見中央骨骼部位包括脊柱和臀部；週邊部位包括前臂、手指、手腕和腳後跟。除超音波檢查外，美國醫學協會指出BMD技術通常涉及使用X射線，並且基於輻射衰減取決於輻射路徑中組織的厚度和組成的原理。所有技術都涉及將結果與規範數據庫進行比較。

【0094】 可替代地，可以藉由監測骨標記水平來測量對一種或多種抗硬骨素抗體的生理反應。骨標記係在骨重塑過程中產生的產物，並且由骨、成骨細胞、和/或破骨細胞釋放。骨吸收和/或骨形成「標記」水平的波動意味著骨重塑/建模的變化。國際骨質疏鬆症基金會(IOF)推薦使用骨標記來監測骨密度療法(參見，例如，Delmas等人，Osteoporos Int. [國際骨質疏鬆症]，增刊6:S2-17 (2000)，藉由引用結合)。指示骨吸收(或破骨細胞活性)的標記包括例如，C-端肽(例如，I型膠原的C末端端肽(CTX)或血清交聯的C端肽)、N-端肽(I型膠原的N末端端肽(NTX))、去氧吡啶啉(DPD)、吡啶啉、尿羥基脯胺酸、半乳糖基羥基賴胺酸、和抗酒石酸酸性磷酸酶(例如，抗酒石酸酸性磷酸酶異構物5b)。骨形成/礦化標記包括但不限於骨特異性鹼性磷酸酶(BSAP)、從I型原膠原(P1NP，PICP)的N末端和C末端延伸釋放的肽、和骨鈣蛋白(OstCa)。若干種套組可商購獲得以檢測和定量臨床樣品(如尿液和血液)中的標記。

【0095】 組合療法

【0096】 藉由靶向相同病原體或生物化學途徑或生物過程的兩種或更多種藥劑組合來治療病理有時導致相對於單獨使用治療相關劑量的每種藥劑而言更大的功效和減少的副作用。在一些情況下，藥物組合的功效係累加的(組合的功效大約等於每種藥物單獨作用的總和)，但在其他情況下，效果係協同的(組合的功效大於單獨給予每種藥物的效果總和)。如本

文所用，術語「組合療法」意指兩種或更多種藥劑以同時方式遞送(例如同時發生地)，或其中首先給予一種藥劑、然後給予第二種藥劑，例如順序地給予。

【0097】 在一些實施方式中，將抗體與標準護理治療劑一起給予，用於治療降低的骨礦物質密度(即，抗體和標準護理治療劑係同一治療計畫的一部分)。如本文所用，術語「標準護理」係指通常被臨床醫生接受用於經診斷患有某種疾病的某類患者的治療。在一些實施方式中，將抗體與第二骨增強劑一起給予用於治療降低的骨礦物質密度或骨缺損。在一些實施方式中，骨增強劑選自由以下各項組成之群組：抗再吸收劑、骨形成劑(即，合成代謝劑)，雌激素受體調節劑(包括但不限於雷洛昔芬(raloxifene)、巴多昔芬(bazedoxifene)、和拉索昔芬(lasofoxifene))和對破骨細胞具有抑制作用的藥物。在一些實施方式中，第二骨增強劑選自由以下各項組成之群組：二磷酸鹽(包括但不限於阿侖膦酸鈉(FOSAMAX®)、利塞膦酸鹽、伊班膦酸鈉(BONIVA®)、和唑來膦酸(RECLAST®))；雌激素或雌激素類似物；抗RANK配位基(RANKL)抑制劑，如抗RANKL抗體(例如，迪諾舒單抗(denosumab)，PROLIA®)；維生素D、或維生素D衍生物、或其模擬物；鈣源、組織蛋白酶-K(cat-K)抑制劑(例如，奧當卡替(odanacatib))、替勃龍(Tibolone)、降鈣素或骨化三醇；和激素替代療法。在一些實施方式中，第二骨增強劑包括但不限於甲狀旁腺素(PTH)或其肽片段、PTH相關的蛋白質(PTHrp)、骨形態發生蛋白質、成骨素、NaF、PGE2激動劑、他汀類、雷尼酸鋇、和硬骨素抑制劑(例如，描述於美國專利案號7,592,429或7,872,106中的抗硬骨素抗體)。在一些實施方式中，第二骨增強劑係Forteo®(特立帕肽)、

Preotact®、或Protelos®。在一些實施方式中，第二吸收劑包含骨形態發生蛋白質(例如，BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-14和/或BMP-15)。

【0098】 在一些實施方式中，採用本文描述的抗體的組合療法可以在給予一種或多種另外的治療劑(例如，第二骨增強劑)之前或之後，以範圍從數分鐘至數週至數月的間隔進行。例如，在彼此的約24小時內，例如在彼此約6-12小時內、或在彼此約1-2小時內、或在彼此約10-30分鐘內給予單獨的模式。在一些情況下，可能需要顯著延長治療時間，其中若干天(2、3、4、5、6、或7天)至若干週(1、2、3、4、5、6、7、或8週)在不同模式的各給藥之間失效。特別考慮了使用組合療法的一種或兩種藥劑/療法的重複治療。

【0099】 *維持治療方案*

【0100】 還考慮了在維持方案中使用第二骨增強劑和/或本文描述的抗體，以例如預防或減緩骨礦物質密度的流失。在這一點上，本文描述的方法或用途視情況包括給予一種或多種量的第二骨增強劑，其在抗體的治療期結束後將骨礦物質密度有效地維持約1週至約5年的維持期。例如，在一些實施方式中，本文描述的方法或用途包含向受試者給予第二骨增強劑持續約至少約1週、約2週、約3週、約4週、約5週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週、約11週、約12週、約3月、約13週、約14週、約15週、約16週、約4月、約17週、約18週、約19週、約20週、約5月、約21週、約22週、約23週、約24週、約6月、約25週、約26週、約27週、約28週、約7月、約29週、約30週、約31週或更久(例如，約8個月、約9個

月、約10個月、約11個月、約1年、約15個月、約18個月、約2年、約3年、約4年、約5年或更久(例如，經受試者的終生)的維持期。在一些實施方式中，維持期係約6-12週。在一些實施方式中，維持期係約4-12週、或約1-3月。在一些實施方式中，維持期係約12-20週、或約3-5月。在一些實施方式中，維持期係約20-32週、或約5-8月。在一些實施方式中，維持期係約24-36週、或約6-9月。在一些實施方式中，維持期係約1年、約2年、約3年、約4年、約5年或更久。「維持」骨礦物質密度包括維持接受抗體治療的受試者中經歷的相似水平的骨礦物質密度參數。

【0101】 套組

【0102】 可以將包含一種或多種本文描述的抗體的藥物組成物與提供關於使用此類藥物組成物的說明書的包裝材料一起放置在容器內(例如，小瓶或注射器)。通常，此類說明書將包括描述抗體濃度，以及在某些實施方式中，可能是重新配製藥物組成物所必需的賦形劑成分或稀釋劑(例如，水、鹽水或PBS)的相對量的明確表現。

實例

實例1 - 洛莫索珠單抗PARG C末端變體的分析

【0103】 野生型洛莫索珠單抗和洛莫索珠單抗PARG C末端變體藉由Lys-C消化，並藉由LC/MS肽圖譜分析。將這兩種構建體的UV圖譜並排比較(圖3)。經確定，野生型洛莫索珠單抗和洛莫索珠單抗PARG C末端變體在37.7分鐘洗脫具有相似的峰，但是經確定，野生型洛莫索珠單抗具有659.3 Da的質量，而經確定，洛莫索珠單抗PARG C末端變體具有886.7 Da的質量。認為洛莫索珠單抗(PGK)的大多數賴胺酸(K)變體被從該過程中去除。當與野生型洛莫索珠單抗PG序列相比時，顯著量的洛莫

索珠單抗PARG C末端變體的醯胺化形式(828.6 Da峰)的存在證實醯胺化效率係序列依賴性的。

【0104】 然後，將PARG C末端變體用羧肽酶(CP-B)處理，並藉由CEX-HPLC方法分析，並與PARG C末端變體對照(其未經CP-B處理)進行對比。在17.5 min和21 min洗脫的峰在處理後有顯著的位移，但對於24 min的峰沒有位移(圖4)。預期24 min峰係雙重醯胺化形式，其被保護免於蛋白水解降解。

實例2 - C末端變體富集

【0105】 藉由陽離子交換層析(CEX)分級實現從包含野生型洛莫索珠單抗和洛莫索珠單抗PARG C末端變體的組成物純化和富集不同的洛莫索珠單抗種類。CEX基於表面電荷的差異分離蛋白質。在設定的pH，在陽離子交換柱(例如，Dionex Pro Pac WCX-10分析柱，2.0 mm x 250 mm)上分離野生型洛莫索珠單抗的帶正電荷的變體，並使用鹽梯度(例如，流動相A：10：90(v/v)ACN、19 mM MES pH 6.2；流動相B：10：90(v/v)ACN、19 mM MES、250 mM NaCl，pH 6.2)洗脫。洛莫索珠單抗的不同C末端變體帶電不同，更多的帶正電荷的變體隨後在CEX中洗脫。因此，洗脫順序係：PG(野生型)、P-醯胺(醯胺化的野生型的脯胺酸)、PARG變體、和PAR-醯胺。可以對馏分收集器進行程式設計以在不同洗脫時間收集含有不同變體的CEX洗脫液。

實例3 - 洛莫索珠單抗PARG C末端變體聚集的分析

【0106】 不受任何特定理論的束縛，預期因為PARG C末端變體係高度帶電的，此類形式將排斥組成物中的非醯胺化形式，從而減少組成物中的聚集。

【0107】 使用SEC-HPLC與野生型洛莫索珠單抗蛋白質A池並排分析洛莫索珠單抗PARG C末端變體蛋白質A池，SEC-HPLC(尺寸排阻HPLC方法)基於其流體動力學體積的差異分離蛋白質(表1)。

【0108】 [表1]

分子	%HMW
AMG785 ARG ProA池	3.4%
AMG785 WT ProA池	7.2%

【0109】 數據表明，與野生型洛莫索珠單抗相比，洛莫索珠單抗PARG C末端變體具有較少的高分子量物質。

實例4 - 洛莫索珠單抗PARG C末端變體的黏度分析

【0110】 使用錐板來分析含有洛莫索珠單抗PARG C末端變體或野生型洛莫索珠單抗的抗體溶液。根據近似的體積消耗將溶液濃縮至120 mg/mL，並使用在280 nm處的蛋白質吸光度(稀釋後最終在0.1-1個吸光度單位(AU)內)和蛋白質特異性消光係數來測定最終濃度($\pm 10\%$)。使用CP-40 軸(spindle)和樣品杯或ARES-G2 電流計(熱分析儀器公司(TA Instruments)，紐卡斯爾，德拉瓦州，美國)，使用TA Smart Swap 2度錐/板軸在Brookfield LV-DVIII錐板儀器(布魯克菲爾德工程公司(Brookfield Engineering)，伯勒，麻塞諸塞州，美國)上進行黏度分析。所有測量均在25°C進行，並藉由附接至樣品杯上的水浴進行控制。藉由增加軸的RPM，在限定的扭矩範圍(10%-90%)內手動收集多個黏度測量值。對測量值求平均值，以便報導每個樣品的一個黏度值，以簡化所得到的比較圖

表。

實例5 - 莫索珠單抗PARG C末端變體的溶度分析

【0111】 為了確定皮下(SC)注射洛莫索珠單抗PARG變體的胺基酸變異與野生型洛莫索珠單抗相比對溶解度的影響，在野生型和PARG-C末端變體洛莫索珠單抗中平行進行透析溶解度測定。此篩選需要將洛莫索珠單抗PARG C末端變體的樣品和野生型洛莫索珠單抗的樣品透析進模擬SC空間的pH和離子強度的溶液中，並監測在很短的時間內抗體在該等條件下的溶解度和物理穩定性。在配製物緩衝液(pH 5.2)中將樣品配製成約63 mg/mL。然後將每個樣品注入透析盒中並透析到PBS緩衝液中以模擬SC空間。在初次透析後24小時進行目測。野生型洛莫索珠單抗通常在24小時後顯示出沈澱。

【0112】 結果顯示在該分析中兩種分子均沈澱，但PARG C末端變體沈澱較少且速率較慢。這表明該變體比野生型更能抵抗沈澱，儘管該變體不能完全消除沈澱。

實例6 - 洛莫索珠單抗PARG C末端變體的擴散分析

【0113】 為了確定洛莫索珠單抗PARG C末端變體的胺基酸變異與野生型洛莫索珠單抗相比對從皮下(SC)空間擴散的影響，使用Scissor(Pion Inc.，比勒利卡，MA)進行測定。此測定需要將樣品(洛莫索珠單抗PARG C末端變體或野生型洛莫索珠單抗)約70 mg/mL注射到模擬的SC空間(由膠原和透明質酸基質組成)中。抗體能夠藉由透析膜擴散出該基質，進入pH 7.4的碳酸鹽緩衝液儲庫中。收集時間點長達3天，並藉由RP-HPLC測定每個時間點的蛋白質濃度。產生的蛋白質濃度對時間曲線模擬來自SC空間的擴散速率。此外，用目視檢查監測SC基質中的沈

澱。

【0114】如上所述，在Scissor中測試野生型和PARG C末端變體洛莫索珠單抗兩者。圖5中顯示的結果表明野生型洛莫索珠單抗以低得多的速率從模擬的SC空間擴散，並且在模擬的注射位點保留比PARG C末端變體洛莫索珠單抗更多的野生型洛莫索珠單抗。

實例7 - FcRn結合

【0115】FcRn(新生兒Fc受體)係MHC I類樣異二聚體，由跨膜 α 鏈(與MHC I類樣分子同源)和 $\beta 2$ 微球蛋白輕鏈組成。FcRn在輕度酸性條件下(約pH 6)與IgG分子的Fc區域的IgG重鏈的C_{H2}與C_{H3}結構域之間的介面結合，並在中性條件下pH(約7.4)釋放。藉由這種高pH依賴性相互作用，FcRn藉由維持血清IgG水平介導成人的IgG穩態。

【0116】使用競爭性結合測定(AlphaScreen[®] binding測定(珀金埃爾默公司(PerkinElmer)，聖約瑟，加利福尼亞州)評估野生型洛莫索珠單抗的Fc結構域和洛莫索珠單抗PARG C末端變體與FcRn的結合。該測定係基於珠的擴增的發光接近性均相測定法(amplified luminescent proximity homogeneous assay，「Alpha」)，其檢測雙分子相互作用。該測定含有兩種珠類型，受體珠和供體珠。受體珠塗有含有噻吩衍生物的水凝膠、以及與組胺酸標記的FcRn(FcRn-His)的組胺酸結構域結合的鎳螯合物。供體珠粒塗有含有酞菁、光敏劑、和鏈黴親和素的水凝膠，其與生物素化的CHO衍生的人類Fc結合。當FcRn-His和生物素化的人類Fc結合在一起時，它們使受體和供體珠緊密接近。當將雷射施加到此複合物上時，藉由供體珠將環境氧轉化為單線態氧。如果珠非常接近，發生了能量轉移至受體珠，這導致光的產生(發光)，這係在裝備的AlphaScreen[®]信號檢測讀板

器中測量的。

【0117】 當抗體以足夠的濃度存在以抑制FcRn-His與生物素化的人類Fc結構域的結合時，觀察到570 nm處的發射的劑量依賴性降低。確定相對於抗體參考標準的測試樣品結合並報告為%相對結合，並且可用於證明抗體的Fc結構域的完整性。預期具有PARG C末端變體的組成物將具有與野生型抗體相似或更好的劑量響應曲線。

【0118】 結果示於圖6中。觀察到野生型洛莫索珠單抗與PARG C末端變體洛莫索珠單抗兩者相似地結合FcRn，並且FcRn結合不被PARG突變所影響。

實例8 - FcγRIIa結合

【0119】 FcγRIIa係在單核細胞、某些樹突細胞、嗜中性粒細胞、B細胞、血小板和NK細胞上表現的活化Fc受體。FcγRIIa(CD32a)係分佈最廣的FcγR，具有兩個胞外Ig樣結構域和對單體IgG的低結合親和力。在人類中存在兩種常見的等位基因變體，其已知存在於FcγRIIa，在位置131處表現組胺酸或精胺酸(分別為131H和131R)。

【0120】 開發競爭性結合測定以評估野生型洛莫索珠單抗和洛莫索珠單抗PARG C末端變體與FcγRIIa(131H)的結合。FcγRIIa(131H)結合測定係基於珠的擴增的發光接近性均相測定法(AlphaScreen®結合測定(珀金埃爾默公司(PerkinElmer)，聖約瑟，加利福尼亞州)，其檢測雙分子相互作用。該測定含有2種珠類型，受體珠和供體珠。受體珠含有螢光團鎔螯合物，並塗有含有麩胱甘肽的水凝膠，麩胱甘肽結合重組人類FcγRIIa(131H)-麩胱甘肽-S-轉移酶(FcγRIIa(131H)-GST)。供體珠塗有含有酞菁、光敏劑、和鏈黴親和素的水凝膠，其與生物素化的人類IgG1結

合。當FcγRIIa(131H)-GST與生物素化的人類IgG1結合在一起時，它們使受體和供體珠子接近。當將雷射施加到此複合物時，環境氧被供體珠轉化為單線態氧。當受體和供體珠接近時，單線態氧在受體珠內擴散，這導致光產生(發光)，這係在裝備用於發光信號檢測的板讀數器中測量的。

【0121】 當抗體以足夠的濃度存在以抑制FcγRIIa(131H)-GST與生物素化的人類IgG1的結合時，測量570 nm處的發射的劑量依賴性降低。確定相對於抗體參考標準的測試樣品結合並報告為%相對結合，並且可用於證明抗體的Fc結構域的完整性。結果示於圖7中。觀察到PARG C末端變體洛莫索珠單抗與FcγRIIa(131H)的相對結合遠高於野生型洛莫索珠單抗。

實例9 - 小鼠藥物動力學研究

【0122】 為了評估體內藥物暴露和生物利用度，在小鼠中進行單劑量藥物動力學研究。將洛莫索珠單抗PARG C末端變體以1 mg/kg的劑量靜脈注射(藉由尾靜脈)或皮下注射。每組使用9隻動物，交錯取樣允許在大量時間點收集數據，而不超過可從單個動物抽取的最大血液量。在每個時間點，抽取0.05 ml血液。在給藥後0.083、24、96和192小時對動物1至3進行取樣。在1、48、168、和240小時對動物4-6進行取樣。在6、72、和192小時對動物7-9進行取樣。從全血樣品中收集血清，並藉由結合免疫測定(如ELISA(酶聯免疫吸附測定))確定測試物的濃度。測試物品濃度隨時間的變化可用於藉由兩室分析計算藥物動力學參數。感興趣的參數包括但不限於每個劑量組的血漿濃度-時間曲線下面積(AUC)、半衰期($t_{1/2}$)和清除率(CL)。生物利用度可以確定為皮下劑量的AUC與靜脈內劑量的AUC的比率。

112年11月29日修正本

【序列表】

<110> 美商安進公司 (Amgen Inc.)

<120> C末端抗體變體

<130> 31173/52080

<140> TW 108111361

<141> 2019-03-29

<150> US 62/650,762

<151> 2018-03-30

<150> US 62/812,741

<151> 2019-03-01

<160> 16

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 190

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<223> 人類硬骨素

<400> 1

Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu
1 5 10 15

Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr
 20 25 30

Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro Phe Glu
 35 40 45

Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu Leu His Phe Thr Arg
 50 55 60

I842702

Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu
65 70 75 80

Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile
85 90 95

Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile
100 105 110

Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly
115 120 125

Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys
130 135 140

Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly
145 150 155 160

Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala
165 170 175

Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr
180 185 190

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<223> 洛莫索珠單抗 HCDR1 (romo HCDR1)

<400> 2

Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 3
<211> 17

I842702

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<223> 洛莫索珠單抗 HCDR2

<400> 3

Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<223> 洛莫索珠單抗 HCDR3

<400> 4

Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<223> 洛莫索珠單抗LCDR1

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 尙未歸類的特徵
<223> 洛莫索珠單抗 LCDR2

<400> 6

Tyr Thr Ser Arg Leu Leu Ser
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 尙未歸類的特徵
<223> 洛莫索珠單抗 LCD3

<400> 7

Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 尙未歸類的特徵
<223> C末端變體序列

<400> 8

Pro Ala Arg Gly
1

<210> 9
<211> 107
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<223> 洛莫索珠單抗重鏈可變區

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<223> 洛莫索珠單抗輕鏈可變區

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

I842702

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<223> C末端變體序列

<400> 11

Pro Ala Arg Gly Lys
1 5

<210> 12
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化的抗體序列

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<223> 洛莫索珠單抗輕鏈

<400> 12

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Asp Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

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

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

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 13

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化的抗體序列

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<223> 無賴胺酸的洛莫索珠單抗重鏈變體

<400> 13

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

I842702

50

55

60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr
115 120 125

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
225 230 235 240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 305 310 315 320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

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

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450

455

460

Ser Pro Ala Arg Gly

465

<210> 14

<211> 470

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化的抗體序列

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<223> 具有賴氨酸的洛莫索珠單抗重鏈變體

<400> 14

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1

5

10

15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn

65

70

75

80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser

85

90

95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val

100

105

110

I842702

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr
115 120 125

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
225 230 235 240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305 310 315 320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

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

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

Ser Pro Ala Arg Gly Lys
 465 470

<210> 15
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 尚未歸類的特徵

<223> SEQ ID NO: 1的胺基酸86-111

<400> 15

Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp
1 5 10 15

Trp Arg Pro Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys
 20 25

<210> 16

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化的抗體序列

<220>

<221> 尙未歸類的特徵

<223> 洛莫索珠單抗重鏈野生型

<400> 16

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr
 115 120 125

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
 210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
 225 230 235 240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

I842702

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305 310 315 320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

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

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

Ser Pro Gly Lys
465

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種抗體，該抗體與SEQ ID NO: 1的硬骨素特異性結合並且包含SEQ ID NO: 2的CDR-H1、SEQ ID NO: 3的CDR-H2、SEQ ID NO: 4的CDR-H3、SEQ ID NO: 5的CDR-L1、SEQ ID NO: 6的CDR-L2、和SEQ ID NO: 7的CDR-L3，其中該抗體包含重鏈，該重鏈包含在該重鏈的C末端的胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)。

【第2項】

如請求項1之抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO: 9中所示的胺基酸序列及SEQ ID NO: 10中所示的胺基酸序列。

【第3項】

如請求項1之抗體，其中該重鏈的C末端被醯胺化。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之抗體，其中兩條重鏈的C末端均包含胺基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)。

【第5項】

如請求項4之抗體，其中兩條重鏈的C末端均被醯胺化。

【第6項】

如請求項1至3中任一項之抗體，該抗體包含SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈胺基酸序列、和SEQ ID NO: 13中所示的重鏈胺基酸序列。

【第7項】

如請求項1或2之抗體，其中該抗體在重鏈的C末端包含含有Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO: 11)的胺基酸序列。

【第8項】

如請求項7之抗體，該抗體包含SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈胺基酸序列、和SEQ ID NO: 14中所示的重鏈胺基酸序列。

【第9項】

一種藥物組成物，該藥物組成物包含如請求項1至8中任一項之抗體和藥學上可接受的載體。

【第10項】

一種藥物組成物，該藥物組成物包含與SEQ ID NO: 1的硬骨素特異性結合的抗體的混合物、和藥學上可接受的載體；

其中該組成物中約3%-5%的抗體係如請求項1至8中任一項之抗體。

【第11項】

如請求項9或10之藥物組成物，其中一或多個該抗體包含單個重鏈，該重鏈包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列。

【第12項】

如請求項9或10之藥物組成物，其中一或多個該抗體包含重鏈，該重鏈包含被醯胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列。

【第13項】

如請求項12之藥物組成物，其中該藥物組成物中小於約35%之該抗體係單醯胺化的。

【第14項】

如請求項10之藥物組成物，其中一或多個該抗體在兩條重鏈中均包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列。

【第15項】

如請求項14之藥物組成物，其中一或多個該抗體包含兩條重鏈，該兩條重鏈在兩條重鏈上均包含被醯胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO: 8)序列。

【第16項】

如請求項15之藥物組成物，其中該藥物組成物中小於約35%之該抗體在兩條重鏈上均被醯胺化。

【第17項】

如請求項9、10及13至16中任一項之藥物組成物，其中該藥物組成物中之該抗體小於約35%包含未被醯胺化的重鏈。

【第18項】

如請求項9、10及13至16中任一項之藥物組成物，其中該藥物組成物中約33%之該抗體未被醯胺化、該藥物組成物中約33%之該抗體包含一條醯胺化的重鏈、並且該藥物組成物中約33%之該抗體包含兩條醯胺化的重鏈。

【第19項】

如請求項9、10及13至16中任一項之藥物組成物，該藥物組成物進一步包含鈣鹽、乙酸鹽緩衝液、多元醇、和表面活性劑。

【第20項】

如請求項19之藥物組成物，其中該鈣鹽包含乙酸鈣。

【第21項】

如請求項19之藥物組成物，其中該乙酸鹽緩衝液包含乙酸鈉。

【第22項】

如請求項19之藥物組成物，其中該多元醇包含蔗糖。

【第23項】

如請求項19之藥物組成物，其中該表面活性劑包含聚山梨醇酯20。

【第24項】

如請求項9、10、13至16及20至22中任一項之藥物組成物，該藥物組成物包含55 mM乙酸鹽、13 mm鈣、6.0%(w/v)蔗糖、0.006%(w/v)聚山梨醇酯20，pH 5.2。

【第25項】

一種如請求項9至24中任一項之藥物組成物之用途，其用於製造增加個體中骨礦物質密度之藥物。

【發明圖式】

```

CCGGGTAAAI GAGCGGCCGC GTTTAAACGG
CCGGGTAAAI GAGCGGCCGC GTTTAAACGG
.....
CCGGGTAAAI GAGCGGCCGC GTTTAAACGG
P G K .

```

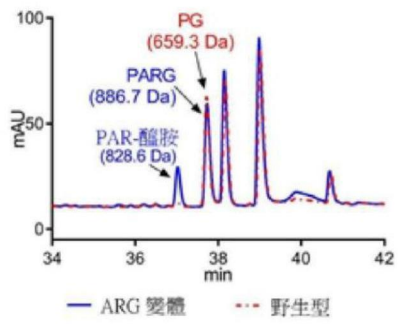
【圖1】

```

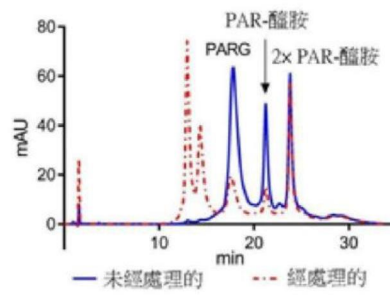
CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACCTTCGC GGI
CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACCTTCGC GGI
.....
CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACCTTCGC GGI
P A R G .

```

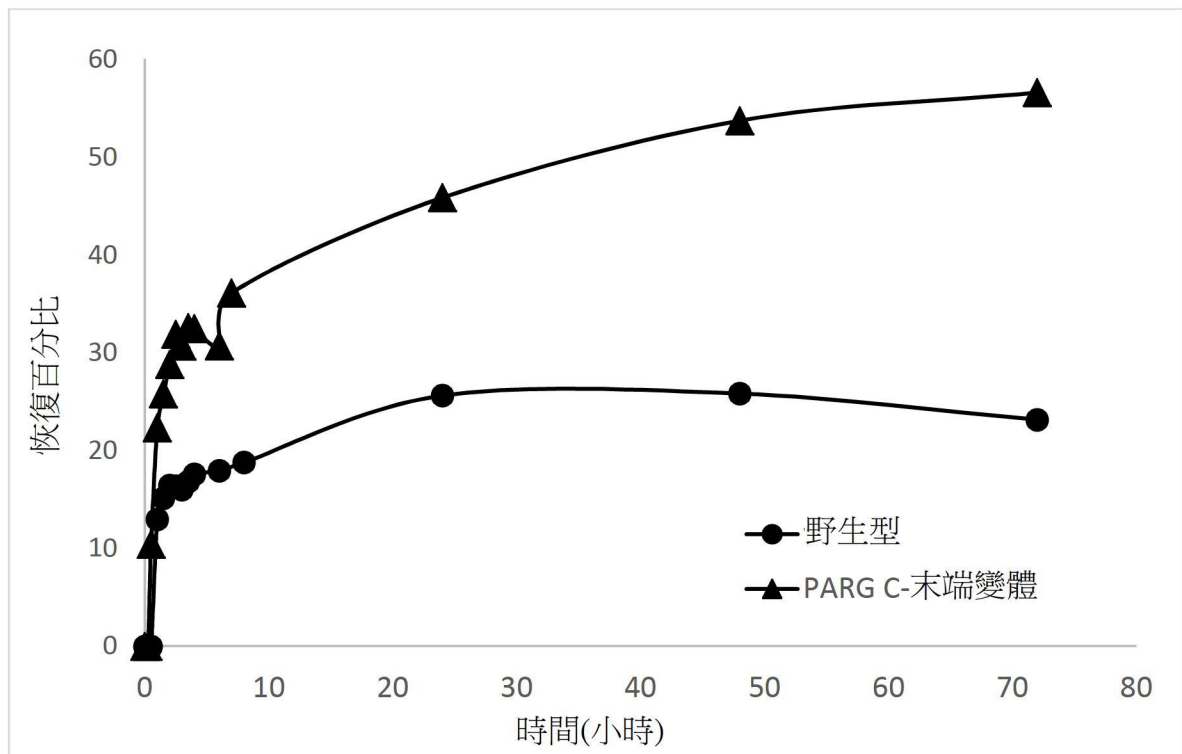
【圖2】



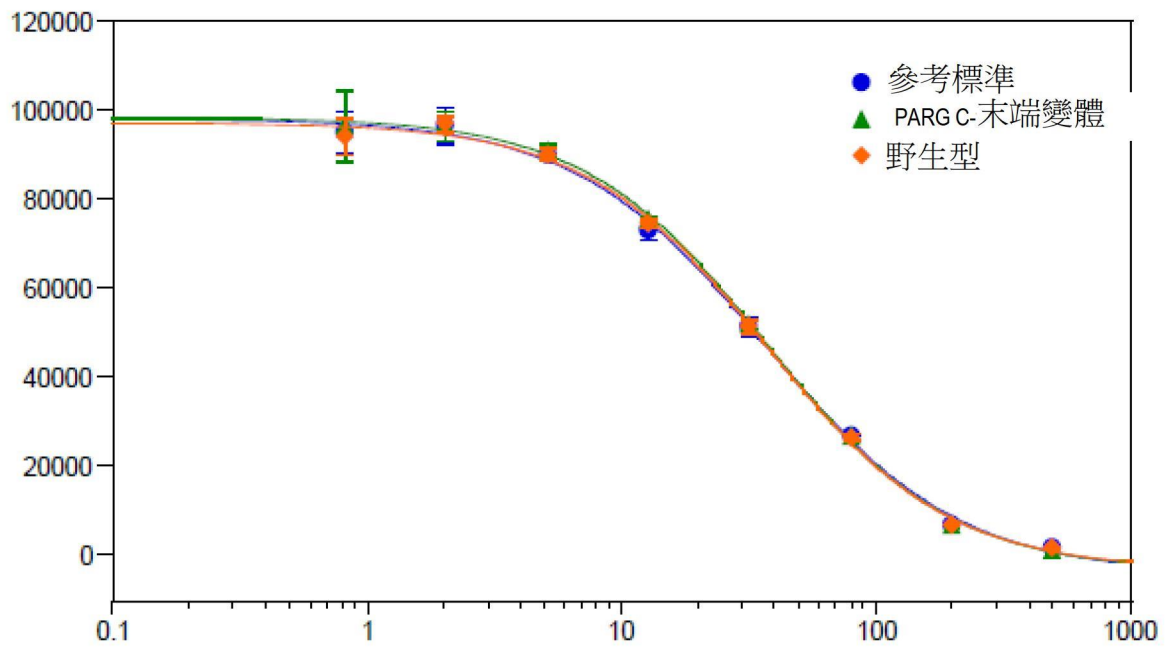
【圖3】



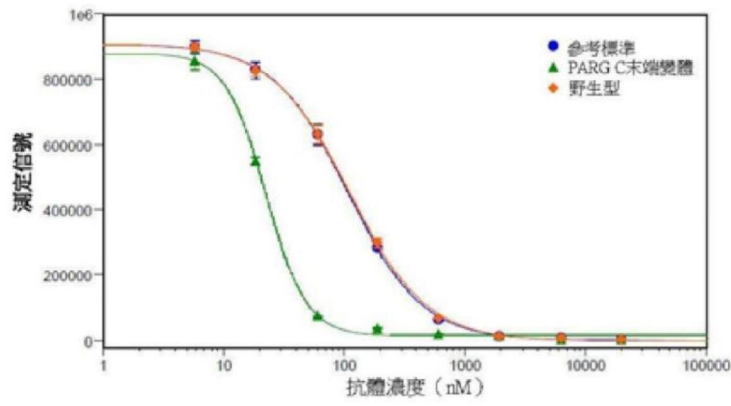
【圖4】



【圖5】



【圖6】



【圖7】