【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成29年6月1日(2017.6.1)

【公表番号】特表2017-508792(P2017-508792A)
【公表日】平成29年3月30日(2017.3.30)
【年通号数】公開・登録公報2017-013
【出願番号】特願2016-573456(P2016-573456)
【国際特許分類】
Ａ６１Ｋ　38/00　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　16/00　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/735　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　19/10　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　29/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　17/06　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　19/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/04　(2006.01)
【ＦＩ】
Ａ６１Ｋ　37/02
Ｃ０７Ｋ　19/00　ＺＮＡ
Ｃ０７Ｋ　16/00
Ｃ０７Ｋ　14/735
Ａ６１Ｐ　35/00
Ａ６１Ｐ　19/10
Ａ６１Ｐ　29/00　１０１
Ａ６１Ｐ　17/06
Ａ６１Ｐ　19/02
Ａ６１Ｐ　35/04

【誤訳訂正書】
【提出日】平成29年4月6日(2017.4.6)
【誤訳訂正１】
【訂正対象書類名】特許請求の範囲
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトのオステオプロテゲリンのアミノ酸１～２１５を含む第一のアミノ酸配列、およびヒトの免疫グロブリンγ－１Ｆｃのアミノ酸１０３～３２９を含む第二のアミノ酸配列を含む、ポリペプチドを含む、ヒトRANKLを阻害する医薬組成物であって、
ここで、該ポリペプチドが、約５×１０$^{-13}$Ｍ以下のＫｄ値でヒトRANKLと結合する、医薬組成物。
【請求項２】
該ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸配列を含んでなる、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
ヒトのオステオプロテゲリンの生物学的に活性な部分およびヒトの免疫グロブリンγ－

１Ｆｃ部分を含む、ヒトRANKLに結合するポリペプチドを含む治療用組成物であって、ここで、該ポリペプチドが、約５×１０$^{-13}$Ｍ以下Ｋｄ値でヒトRANKLと結合する、治療用組成物。
【請求項４】
約２５ｍＭのリン酸ナトリウム、約５０ｍＭから約１００ｍＭのＮａＣｌ、約２０ｍＭから約２５ｍＭのＬ－アルギニン塩酸塩をさらに含み、約６．３～約６．８のｐＨ値を有する、請求項３に記載の治療用組成物。
【請求項５】
約１０ｍｇ／ｍＬのスクロースをさらに含む、請求項４に記載の治療用組成物。
【請求項６】
約１０ｍｇ／ｍＬから約２５ｍｇ／ｍＬのマンニトールをさらに含む、請求項４に記載の治療用組成物。
【請求項７】
３ｍｇ／ｋｇの用量での皮下投与後、カニクイザルにおける体循環中の該ポリペプチドの半減期が、少なくとも４８時間である、請求項３に記載の治療用組成物。
【請求項８】
１０ｍｇ／ｋｇの用量での皮下投与後、カニクイザルにおける体循環中の該ポリペプチドの半減期が、少なくとも３８時間である、請求項３に記載の治療用組成物。
【請求項９】
骨リモデリングに関連する疾患の治療または予防のための医薬の製造のための薬物の使用であって、該薬物が配列番号１のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、使用。
【請求項１０】
該疾患が、癌腫である、請求項９に記載の使用。
【請求項１１】
該疾患が、乳癌である、請求項９に記載の使用。
【請求項１２】
該疾患が前立腺癌である、請求項９に記載の使用。
【請求項１３】
該疾患が、多発性骨髄腫である、請求項９に記載の使用。
【請求項１４】
該疾患が、骨肉腫である、請求項９に記載の使用。
【請求項１５】
該疾患が、固形腫瘍による骨転移である、請求項９に記載の使用。
【請求項１６】
該疾患が、骨粗鬆症である、請求項９に記載の使用。
【請求項１７】
該疾患が、関節リウマチである、請求項９に記載の使用。
【請求項１８】
該疾患が、乾癬性関節炎である、請求項９に記載の使用。
【請求項１９】
骨リモデリングに関連する疾患または状態を治療または予防する方法であって、骨リモデリングに関連する疾患の治療または予防を必要とする患者に、治療上有効な量の配列番号１の配列を含むポリペプチドを含む医薬組成物を投与することを含む、方法。
【請求項２０】
該疾患が、転移性癌腫である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
該疾患が、癌腫である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
該疾患が、乳癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】

該疾患が、前立腺癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２４】
該疾患が、多発性骨髄腫である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２５】
該疾患が、骨肉腫である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２６】
該疾患が、固形腫瘍による骨転移である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２７】
該疾患が、骨粗鬆症である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２８】
該疾患が、関節リウマチである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２９】
該疾患が、乾癬性関節炎である、請求項１９に記載の方法。
【誤訳訂正２】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【発明の詳細な説明】
【発明の名称】オステオプロテゲリンに由来するＲＡＮＫＬ阻害剤
【技術分野】
【０００１】
一般に、本発明は、生物学的薬剤、ならびに例えば腫瘍学における骨吸収に関連する病状におけるそれらの使用の分野に関する。より具体的には、本発明は、NF-κBリガンド（RANKL）の受容体活性化因子に結合するオステオプロテゲリン(OPG)に由来する組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
このセクションに記載されるアプローチは継続して研究され得て、必ずしもこれまでに考えられたか遂行されてきたアプローチである必要はない。したがって、特に他に明記しない限り、このセクションに記載されるアプローチのいずれかが、単にこのセクションに含まれることにより、先行技術とみなされるものと仮定されるべきではない。
【０００３】
骨転移は、固形腫瘍を有する患者の１５－７５％および多発性骨髄腫を有する患者のほぼ１００％に発生する、固形腫瘍および血液の癌の両方の共通の合併症である。骨に転移する可能性が最も高い癌としては、乳癌、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌および腎臓癌が含まれる。異なる癌種における骨転移の割合は、以下の通りである：
－多発性骨髄腫－７０～９５％　－乳癌－６５～７５％　－前立腺癌－６５～７５％　－肺癌－３０～４０％　－腎臓癌－４０％　－膀胱癌－２０～２５％　－メラノーマ－１４～４５％。
【０００４】
骨転移の骨格の合併症は、疼痛、病理学的骨折、脊髄圧迫および他の神経圧迫症候群に起因する顕著な罹患率を説明する。
【０００５】
骨転移は、溶骨性、骨硬化性（造骨性）、または混合型であり得る。正常な骨再構築（リモデリング）は骨芽細胞および破骨細胞によってバランスのとれた順序で制御される。腫瘍壊死因子ファミリーのメンバーである核因子κＢ(RANK)リガンド(RANKL)の受容体活性化因子は、骨芽細胞の表面上に発現される。RANKLは、破骨細胞前駆体上の受容体RANKに結合し、それにより、TNF受容体関連因子（TRAF）が介在するシグナル伝達および核内の核因子κBの活性化をもたらし、それにより骨を分解または再吸収する成熟破骨細胞へ

の分化を誘導する。他の破骨細胞活性化因子には、副甲状腺ホルモン関連タンパク質、インターロイキン類およびケモカイン類が含まれる。RANKLのデコイ受容体であるオステオプロテゲリンは、骨髄に存在し、骨芽細胞と破骨細胞との平衡を保つ。

【０００６】

癌における骨転移において、RANKL、RANKおよびOPGの間のクロストークは混乱している。転移がインターロイキン、副甲状腺ホルモン関連タンパク質、およびRANKL発現を上方制御する他の因子を放出するとき、破骨細胞の活性化が増強される。これらの因子はまた、OPGも阻害し得る。さらに、骨病変から放出された成長因子は、腫瘍細胞の増殖を刺激し、悪循環を引き起こす(Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med 2004; 350:1655-64; Vallet S, smith MR, Rage N. Novel bone-targeted strategies in oncology. Clin Cancer Res 2010;16:4084-93; Marathe A, Peterson MC, Mager DE. Integrated cellular bone homeostasis model for denosumab pharmacodynamics in multiple myeloma patients. J Pharmacol Exp Ther 2008; 326:555-562; George S, Brenner A, Sarantopoulos J, Bukowski RM. RANK ligand: effects of inhibition. Curr Oncol Rep 2010;12: 80-86)。

【０００７】

ヒトOPG(GenBank: U94332.1)は、グルタミン酸２２の前で切断されて３８０アミノ酸の成熟した可溶性タンパク質を生じる、２１個のアミノ酸のシグナルペプチドを含む４０１アミノ酸のタンパク質である。OPGは、そのN末端部分に４つのシステインに富むTNFR様ドメインを含む腫瘍壊死因子受容体(TNFR)ファミリーのメンバーである。OPGは骨の発達において役割を果たすことが示されており、OPG遺伝子をマウスは骨粗鬆症の表現型および肉眼的な骨格異常を有していた。

【０００８】

骨芽細胞および骨髄間質細胞によって産生されるOPGは、明らかな直接シグナル伝達機能を有さない分泌型デコイ受容体として働く。OPGは、その天然リガンドである破骨細胞分化抑制因子リガンド(OPGL)（RANKLとしても公知）に結合することによって作用する。OPGとRANKLとの結合は、RANKLが破骨細胞分化、活性化および生存に不可欠な破骨細胞受容体であるその同族受容体RANKを活性化するのを妨げる。

【０００９】

組換えOPGは、それぞれ約５５kDaおよび約１１０kDaの見かけの分子量の単量体および二量体の形態で存在する。N末端ドメインの残基システイン１８５の切断は、おそらくTNFR様ドメインのジスルフィド結合を破壊することにより、結果的にOPG不活性化をもたらすが、一方、該タンパク質のＣ末端部分の残基１９４の切断は、生物活性を変化させない。

【００１０】

トランスジェニックマウスにおけるOPGの過剰発現は、マウスに破骨細胞がほぼ完全に欠如していることを特徴とする深刻な骨減少症をもたらす。逆に、OPG遺伝子の欠失は、マウスにおいて重度の骨粗鬆症を引き起こし、骨吸収の調節におけるOPGの重要な生理学的役割を示している。骨芽細胞および間質細胞からのOPGおよびRANKLの分泌は、多数のホルモンおよびサイトカインによって調節される。OPGおよびRANKL産生の相対的レベルは、骨吸収の程度を制御すると考えられている：RANKLの発現は骨吸収を増加させるが、過剰なOPGは逆の効果を有する。組換えOPGは、インビトロおよびインビボで、破骨細胞を刺激する因子の大部分の効果を阻止する。OPGはまた、卵巣摘出、骨粗鬆症の誘発、悪性腫瘍の体液性高カルシウム血症および実験的骨転移を含む、様々な動物疾患モデルにおける骨吸収を阻害する。したがって、OPGは、過剰な破骨細胞活性に関連する疾患に対する有効な治療的選択肢である可能性がある（Kostenuik PJ, Shalhoub V., Curr Pharm Des. 2001 May; 7（8）：613-35）。

【００１１】

RANK/RANKL経路は、骨転移の有効な治療であることが判明している周知の標的である。デノスマブは、ヒトRANKLに結合し、そのRANKとの相互作用を阻害する高親和性モノクローナル抗体であり、それ故に、OPG作用機序と同様である。デノスマブは、チャイニーズ

ハムスター卵巣（CHO）細胞で産生された、２つの重鎖およびκサブクラスの２つの軽鎖からなるIgG2サブクラスの完全長ヒトモノクローナル抗RANKL抗体である。デノスマブ（商品名：Prolia）は、米国食品医薬品局（FDA）によって、閉経後の女性の骨粗鬆症の予防および治療のために承認された。商品名Xgevaというデノスマブは、米国食品医薬品局（FDA）によって、固形腫瘍からの骨転移を有する患者の骨格関連事象を予防するために承認された。他の骨リモデリングに関連する病状のための、すなわち他の癌形態由来の骨転移のためのデノスマブの更なる臨床試験が現在進行中である（Lipton A et al., Randomized Active-Controlled Phase II Study of Denosumab Efficacy and Safety in Patients With Breast Cancer-Related Bone MetastasesJ Clin Oncol 25 :4431-4437 (2007); Neville-Webbe HL, Coleman RE. Bisphosphonates and RANK ligand inhibitors for the treatment and prevention of metastatic bone disease. Eur J Cancer 2010; 46:1211-1222; Santini D, Galluzzo S, Zoccoli A, Pantano F, Fratto ME, et al. New molecular targets in bone metastases. Cane Treat Rev 2010; 36S3:S6-10)。

【００１２】

従って、RANKLに結合することができ、受容可能な薬理学的プロフィールを有しながら、より広い治療可能性を有する、天然に存在するOPG分子に基づく治療用組成物を開発することが望ましいであろう。

【発明の概要】

【００１３】

この概要は、以下の「詳細な説明」でさらに説明する概念の選択を簡略化した形で説明するために提供される。この概要は、主張される主題の重要な特徴または本質的な特徴を特定することを目的とせず、主張される主題の範囲を決定するために使用されることも意図されていない。

【００１４】

特定の面において、本発明は、約５×１０$^{-13}$Ｍ以下のＫｄ値でヒトRANKLに結合するポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。ポリペプチドは、ヒトオステオプロテゲリン(GenBank: U94332.1)のアミノ酸１から２１５を含む第１のアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリンγ－１　Ｆｃ（GenBank：J00228.1）のアミノ酸１０３から３２９を含む第２のアミノ酸配列をさらに含む。ポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸配列を含んでいてよい。

【００１５】

特定の面において、本発明は、治療用組成物を提供する。組成物は、ヒトRANKLに結合するポリペプチドを含む。ポリペプチドは、ヒトオステオプロテゲリンの生物学的に活性な部分およびヒト免疫グロブリンγのＦｃ部分を含む。ポリペプチドは、約５×１０$^{-13}$Ｍ以下のＫｄ値でヒトRANKLに結合する。

【００１６】

ポリペプチドは、治療組成物の３mg／kgの用量での皮下投与後、少なくとも４８時間のカニクイザルにおける全身循環における半減期を示し得る。ポリペプチドは、治療組成物を１０mg／kgの用量で皮下投与した後、少なくとも３８時間のカニクイザルにおける全身循環における半減期を示し得る。

【００１７】

１．この治療用組成物はまた、約２５ｍＭのリン酸ナトリウム、約５０ｍＭ～約１００ｍＭのＮａＣｌ、約２０～約２５ｍＭのＬ－アルギニン塩酸塩を含んでいてよく、約６．３～約６．８のｐＨ値を有する。治療用組成物はまた、約１０ｍｇ／ｍＬのスクロースを含み得る。治療用組成物はまた、約１０ｍｇ／ｍＬ～約２５ｍｇ／ｍＬのマンニトールを含み得る。

【００１８】

ある面では、本発明は、骨吸収または骨リモデリングに関連する疾患の治療または予防のための医薬の製造を目的とする、物質の使用を提供する。該物質は、ヒトRANKLに結合するポリペプチドを含む。このポリペプチドは、ヒトオステオプロテゲリンのアミノ酸１

～２１５を含む第１のアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリンγ－１Ｆｃのアミノ酸１０３～３２９を含む第２のアミノ酸配列をさらに含む。ポリペプチドにおける第１のアミノ酸配列は、第２のアミノ酸配列に先行していてよい。ポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸配列を含んでいてよい。骨吸収または骨リモデリングに関連する疾患は、癌腫、乳癌、前立腺癌、多発性骨髄腫、骨肉腫、固形腫瘍による骨転移、骨粗鬆症、関節リウマチまたは乾癬性関節炎であり得る。

【００１９】

ある面では、本発明は、骨吸収または骨リモデリングに関連する疾患を治療または予防する方法を提供する。この方法は、骨吸収または骨リモデリングに関連する疾患の治療または予防を必要とする患者に、ヒトRANKLに結合するポリペプチドを含む医薬組成物の治療有効量を投与することを含む。このポリペプチドは、ヒトオステオプロテゲリンのアミノ酸１～２１５を含む第１のアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリンγ－１ Ｆｃのアミノ酸１０３～３２９を含む第２のアミノ酸配列をさらに含む。ポリペプチドにおける第１のアミノ酸配列は、第２のアミノ酸配列に先行していてよい。ポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸配列を含んでいてよい。骨吸収または骨リモデリングに関連する疾患は、癌腫、乳癌、前立腺癌、多発性骨髄腫、骨肉腫、固形腫瘍による骨転移、骨粗鬆症、関節リウマチまたは乾癬性関節炎であり得る。

【００２０】

本明細書に記載されたこれらの、および他の面および利点は、添付の図面および以下の詳細な説明を考慮することにより明らかになるであろう。

【００２１】

以下の図面および説明は、本発明についての理解を助けるために提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】図１は、BIAcore X100によって生成された種々のrshRANKL濃度でのデノスマブの会合および解離曲線を示す。

【図２】図２は、BIAcore X100によって生成された異なるRANKL濃度での配列番号１のポリペプチドの会合および解離曲線を示す。

【図３】図３は、０日の時点(パネルＡ)、６７日の時点(パネルＢ)および１７６日の時点(パネルＣ)での、配列番号１のポリペプチドの代表的なサイズ排除（SEC）HPLCクロマトグラムを示す。

【図４】図４は、配列番号１の霊長動物の単一のポリペプチドについて、０．３、３、１０および３０ｍｇ／ｋｇの用量で皮下投与されたときのCmaxおよびAUC_{last}の用量線形を示す。

【図５】図５は、配列番号１の霊長動物の単一のポリペプチドについて、０．３、３、１０および３０ｍｇ／ｋｇの用量で皮下投与されたときのCmaxおよびAUC_{last}の用量によって補正された結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２３】

発明の詳細な説明

本明細書に記載される教示は、部分的に、ヒトIgGのＦｃ部分に融合されるOPGの生物学的に活性なＮ末端部分を含むタンパク質分子の操作に基づく。このようなOPG由来のタンパク質分子の組換え産生を可能にするために、異種タンパク質発現系でタンパク質分子を過剰産生するためのＤＮＡ発現ベクターが構築され、哺乳動物細胞はタンパク質分子を安定して高発現レベルで発現するように調製されている。本明細書に記載の組成物の設計、調製および予備的特徴付けは、部分的に、２０１３年１０月３日に公開された国際特許出願公開ＷＯ／２０１３／１４７８９９に開示されており、その全体が引用により本明細書中に包含される。

【００２４】

組換え供給源由来のタンパク質分子は、溶液中でホモ二量体およびホモ四量体を形成し

た。タンパク質精製手順は、タンパク質分子の生理学的に関連する実質的に純粋なホモ二量体調製物を得ることを可能にするように考案されている。予期しないことに、精製されたタンパク質分子は、インビトロ結合アッセイにおいて、RANKLに対する非常に高い結合親和性を実証する。医薬製剤は、霊長動物へのタンパク質分子の皮下および静脈内投与を可能にするように考案された。したがって、処方されたタンパク質分子は、霊長動物への皮下および静脈内投与の際に容認できる薬物動態プロファイルを示す。さらに、このように処方されたタンパク質分子は、ヒトへの皮下投与の際に実質的な全身曝露を示す。

【００２５】

本明細書で用いる用語は、一般に、本発明の文脈内で、そして各用語が使用される特定の文脈において、当技術分野における通常の意味を有する。特定の用語は、本発明の組成物および方法、ならびにそれらを作製および使用する方法を説明する際に、実施者に追加の指針を提供するために、以下にまたは本明細書の他の箇所で論じられる。用語の任意の使用の範囲または意味は、その用語が使用される特定の文脈から明らかであろう。「約」および「およそ」は、一般に、測定の性質または精度を考慮して、測定された量に対する許容可能な誤差の程度を意味するものとする。一般的には、誤差の例示的程度は、所与の値または値の範囲の２０％以内、好ましくは１０％以内、より好ましくは５％以内である。あるいは、特に生体系において、「約」および「およそ」なる用語は、所与の値の１０倍以内、好ましくは５倍以内、より好ましくは２倍以内の値を意味し得る。本明細書に記載の数値は、特に他に明記しない限り、おおよそのものであり、「約」または「およそ」なる用語は、明示的に記載されていないときに推測可能なことを意味する。

【００２６】

本発明の方法は、野生型配列を１以上の変異体（配列変異体）に対して比較することを含む、配列を互いに比較する工程を含み得る。そのような比較は、一般的には、例えば、当技術分野で周知の配列アラインメントプログラムおよび／またはアルゴリズム（例えば、いくつか例を挙げるとBLAST、FASTAおよびMEGALIGN）を用いる、ポリマー配列のアラインメントを含む。当業者は、変異が残基の挿入または欠失を含む場合、かかるアラインメントにおいて、配列アラインメントが、欠失または挿入された残基を含まないポリマー配列において「ギャップ」（一般的にはダッシュまたは“Ａ”で表される）を導入することを容易に認識し得る。

【００２７】

本発明の方法は、例えばＩＣ５０値またはＥＣ５０値などの決定のような統計計算を含んでいてよい。当業者は、かかる方法を、種々の市販のソフトウェア、例えば、PRISM（GraphPad Software Inc, La Jolla, CA）またはこれに類するものを用いて行なうことができることを容易に認識し得る。

【００２８】

“同種の”とは、その文法的な形式およびスペルのバリエーションの全てにおいて、同じ生物種のスーパーファミリー由来のタンパク質、ならびに異なる生物種由来の同種タンパク質を含む“共通の進化的起源”を有する２つのタンパク質間の関係を意味する。そのようなタンパク質（およびそれらをコードする核酸）は、同一性の割合または特定の残基もしくはモチーフおよび保存された位置の存在のいずれの観点かにかかわらず、その配列類似性によって反映されるように、配列相同性を有する。しかしながら、一般的な使用および本特許出願では、“相同”という用語は、“高度に”などの副詞で修飾された場合、配列類似性を意味し、共通の進化的起源に関連しても、関連しなくてもよい。

【００２９】

すべての文法的形式における用語“配列類似性”は、共通の進化的起源を共有してもよいし、共有しなくてもよい、核酸配列またはアミノ酸配列間の同一性または対応性の程度を意味する。

【００３０】

用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は互換的に使用される。一般に、哺乳動物における使用のための本発明のOPG由来タンパク質は、CHOまたはHEK293細胞株のような適

切な翻訳後修飾を可能にする哺乳動物細胞において発現されるが、他の哺乳動物発現細胞株も同様に有用であることが期待される。従って、OPG由来タンパク質は、それらの生物学的機能に実質的に影響を及ぼすことなく翻訳後修飾され得ることが予期される。

【００３１】

ある面では、本発明のOPG由来タンパク質分子の機能的変異体は、ヒトOPGの少なくとも生物学的に活性な部分および１つまたは複数の融合ドメインを有する融合タンパク質を含む。かかる融合ドメインの周知の例には、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン、プロテインＡ、プロテインＧ、免疫グロブリン重鎖定常領域（例えば、Ｆｃ）、マルトース結合タンパク質（MBP）、またはヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されない。融合ドメインは、所望の特性を付与するように選択することができる。例えば、OPGポリペプチド部分は、場合により適切なペプチドリンカーを介してインビボでOPGポリペプチドを安定化させるドメイン（“安定化”ドメイン）と融合させることができる。“安定化する”という用語は、これが破壊の減少、クリアランスの減少または他の薬物動態学的効果のためであるかどうかにかかわらず、全身循環におけるポリペプチドの半減期を増加させるものを意味する。免疫グロブリンのＦｃ部分との融合は、特定のタンパク質に対して望ましい薬物動態学的特性を付与することが知られている。同様に、ヒト血清アルブミンとの融合は望ましい特性を与えることができる。選択することができる他のタイプの融合ドメインには、追加の生物学的機能を付与する、例えばインビボで標的とされた作用部位での蓄積を促進する、多量体化（例えば、二量体化、四量体化）ドメインおよび機能的ドメインが含まれる。

【００３２】

ある面では、本発明は、ヒトOPG（GenBank：U94332.1）の先頭２１５個のアミノ酸、続いてヒトＩｇガンマ－１（GenBank：J00228.1）のＦｃ部分の２２７個のアミノ酸を含むポリペプチドを提供する。例示的な態様では、本発明のタンパク質分子は、配列番号１のアミノ酸配列を含む。

【００３３】

hOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチド(配列番号１)

【化１】

```
MNKLLCCALV FLDISIKWTT QETFPPKYLH YDEETSHQLL CDKCPPGTYL KQHCTAKWKT     60
VCAPCPDHYY TDSWHTSDEC LYCSPVCKEL QYVKQECNRT HNRVCECKEG RYLEIEFCLK    120
HRSCPPGFGV VQAGTPERNT VCKRCPDGFF SNETSSKAPC RKHTNCSVFG LLLTQKGNAT    180
HDNICSGNSE STQKCGIDVT LCEEAFFRFA VPTKFDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP    240
KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV    300
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL    360
TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC    420
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK                                             442
```

【００３４】

ある面では、本発明は、場合によりフレキシブルリンカーを介して連結されている、ヒトOPGの先頭２１５個のアミノ酸、続いてヒトＩｇガンマ－１のＦｃ部分の２２７個のアミノ酸を含むポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する組換えDNA分子を提供する。例示的な態様では、本発明の組換えDNA分子は、配列番号２のヌクレオチド配列を含む。

【００３５】

hOPG-hIgG1-Ｆｃ DNA(配列番号２)

【化２】

```
ATGAATAAGC TGCTGTGCTG TGCCCTCGTG TTTCTCGATA TAAGCATTAA GTGGACTACC        60
CAGGAGACAT TCCCTCCTAA GTATCTGCAC TATGACGAGG AGACAAGCCA TCAGCTGCTG       120
TGCGATAAGT GTCCTCCTGG GACCTATCTC AAACAACATT GTACAGCCAA ATGGAAGACA       180
GTCTGCGCTC CATGTCCTGA CCACTACTAC ACCGACTCTT GGCATACTAG CGACGAATGT       240
CTGTATTGTT CACCCGTGTG CAAGGAGCTG CAATACGTGA AACAGGAATG CAATAGGACA       300
CATAACCGCG TGTGTGAATG CAAAGAGGGC AGGTATCTGG AGATCGAATT TTGTCTGAAG       360
CACCGGAGCT GCCCACCCGG CTTTGGAGTG GTCCAGGCCG GGACTCCCGA GAGAAACACT       420
GTGTGCAAAA GATGCCCAGA CGGATTCTTT TCAAACGAGA CATCTTCTAA GGCACCATGT       480
CGGAAGCACA CTAACTGTTC CGTCTTTGGG CTGCTGCTCA CCCAGAAGGG CAATGCCACC       540
CACGATAATA TTTGCTCCGG AAACTCCGAA TCCACCCAAA AGTGCGGGAT AGATGTTACC       600
CTCTGCGAAG AGGCATTCTT CCGCTTCGCT GTTCCTACCA AGTTCGACAA AACTCACACA       660
TGCCCACCGT GCCCAGCTCC GGAACTCCTG GGCGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA       720
AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC       780
GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT       840
AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC       900
CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC       960
AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA      1020
CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG      1080
ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG      1140
CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC      1200
CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC      1260
TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG      1320
GGTAAA                                                                 1326
```

【００３６】

ある面では、本発明は、場合によりフレキシブルリンカーを介して連結されている、ヒトOPGの先頭２１５個のアミノ酸、続いてヒトＩｇガンマ－１のＦｃ部分の２２７個のアミノ酸を含むポリペプチドの高発現のための組換え哺乳動物発現プラスミドを提供する。このプラスミドは、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写を駆動するサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、続いてbGHポリアデニル化および転写終結配列を含む。このプラスミドはまた、細菌のプラスミド増殖および選択を支持するために、pUC複製起点およびアンピシリン耐性を付与するβ-ラクタマーゼ遺伝子を含む。プラスミドはさらに、安定なCHOK1およびNSO細胞株を確立するために広く使用される選択マーカーであるグルタミン合成酵素の遺伝子を含む。

【００３７】

例示的な態様では、本発明の哺乳動物発現プラスミドは、配列番号３のヌクレオチド配列を含む。

【００３８】

hOPG-hIgG1-Ｆｃ発現プラスミド(配列番号３)

【化３－１】

```
GAATTCATTG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG CTTTAAAAAA        60
CCTCCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA TAAAATGAAT GCAATTGTTG TTGTTAACTT       120
GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA       180
AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA       240
TGTCTGGCGG CCGCGAGACG CCATCCACGC TGTTTTGACC TCCATAGAAG ACACCGGGAC       300
CGATCCAGCC TCCGCGGCCG GGAACGGTGC ATTGGAACGC GGATTCCCCG TGCCAAGAGT       360
GACGTAAGTA CCGCCTATAG AGTCTATAGG CCCACCCCCT TGGCTTCTTA TGCATGCTAT       420
ACTGTTTTTG GCTTGGGGTC TATACACCCC CGCTTCCTCA TGTTATAGGT GATGGTATAG       480
CTTAGCCTAT AGGTGTGGGT TATTGACCAT TATTGACCAC TCCCCTATTG GTGACGATAC       540
TTTCCATTAC TAATCCATAA CATGGCTCTT TGCCACAACT CTCTTTATTG GCTATATGCC       600
AATACACTGT CCTTCAGAGA CTGACACGGA CTCTGTATTT TTACAGGATG GGGTCTCATT       660
TATTATTTAC AAATTCACAT ATACAACACC ACCGTCCCCA GTGCCCGCAG TTTTTATTAA       720
ACATAACGTG CTCCACGCGA ATCTCGGGTA CGTGTTCCGG ACATGGGCTC TTCTCCGGTA       780
GCGGCGGAGC TTCTACATCC GAGCCCTGCT CCCATGCCTC CAGCGACTCA TGGTCGCTCG       840
GCAGCTAGTG GAGGCCAGAC TTAGGCACAG CACGATGCCC ACCACCACCA GTGTGCCGCA       900
CAAGGCCGTG GCGGTAGGGT ATGTGTCTGA AAATGAGCTC GGGGAGCGGG CTTGCACCAA       960
AAATTTTCGC GTCGACTATA CCGTCCACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA      1020
CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCCTG ACGAGCATCA      1080
CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC      1140
GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA      1200
CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA      1260
TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA      1320
GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA      1380
```

【化３－２】

```
CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG   1440
TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG   1500
TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG   1560
CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA   1620
AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA   1680
AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT   1740
TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA   1800
CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCATC   1860
CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG   1920
CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT   1980
AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT   2040
CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG   2100
CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC   2160
ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA   2220
AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC   2280
ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT   2340
TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG   2400
TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT   2460
GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG   2520
ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC   2580
CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC   2640
GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA   2700
GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG   2760
GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACCTC GACGGATCGG GAGATCTCCC   2820
GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT   2880
CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG CGAGCAAAAT TTCTGTGGAA   2940
TGTGTGTCAG TTAGGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG   3000
CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCAGGTG TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG   3060
AAGTATGCAA AGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC   3120
CATCCCGCCC CTAACTCCGC CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT   3180
TTTTATTTAT GCAGAGGCCG AGGCCGCCTC TGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG   3240
AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AAAGCTAAGC TACAACAAGG CTCTGGCTAA   3300
CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAAGCTAGCT TAATACGACT CAATGAATCA   3360
GGGTGCAAAC AAGACGGTAT TAGACCGATA TTTACGGTTA GATATCCCGG ACCAGAAATG   3420
TCAAGCTATG TACATCTGGG TCGATGGAAC CGGCGAAAAC CTCCGCTCTA AGACCAGGAC   3480
ACTCAACTTT ACTCCTAAAT CTCCCAGTGA GCTGCCAATA TGGAATTTCG ATGGGTCATC   3540
AACGGGCCAG GCCGAACGGA GCAACAGTGA CGTGTACCTG TATCCAGTCG CTGTTTATCG   3600
AGATCCATTC AGGCTGGGTA ACAATAAGCT GGTCCTCTGT GAAACCTACA AATACAACAA   3660
```

【化３－３】

```
GAAGCCTGCT GATACTAACC AGCGTTGGAA GTGTATGGAA GTAATGACAA GGGCAGCAGA      3720
CCAGCACCCA TGGTTCGGCA TGGAACAAGA ATATACTCTT TTGGACATTG ACAAACATCC      3780
CTTGGGTTGG CCCAAGAATG GCTATCCAGG CCCTCAGGGT CCCTATTACT GTGGTGTGGG      3840
TGCTAATAGG GTGTATGGGC GCGATGTGGT CGAGGCTCAC TACAGGGCGT GTCTTTGCGC      3900
TGGCATCAAC ATCTCTGGGG AGAACGCGAA AGTCATGCCG GCCCAATGGG AGTTCCAGGT      3960
TGGTCCGTGT GAAGGCATAA CCATGGGCGA CGACCTCTGG ATGGCTCGCT ACCTTCTTCA      4020
CAGGGTCGCT GAGGACTTTG ATGTTGTAGT AACACTCGAC CCCAAGCCAA TCCCTGGTGA      4080
CTGGAACGGC GCTGGAATGC ACACTAATTT CTCTACTGAA GCCATGCGTG GTCCCAATGG      4140
CATTCTGGAA ATTGAGAGTG CCATCGACAA ATTGTCGAAG GTTCATGAGA AACACATCAA      4200
GGCATACGAC CCACACGCAG GCAAGGATAA CGAAAGGCGC TTGACTGGTC ATTATGAAAC      4260
TTCCTCCATC CATGACTTTT CTGCAGGTGT GGCCAACCGT GGTGCCTCCA TCCGCATCCC      4320
CAGAGGAGTG GCTGAGGAGA AAACCGGCTA CCTGGAGGAC CGTCGCCCTT CCTCCAACGC      4380
TGACCCTTAT GTGGTGTCTG AGAGGCTTGT GCGTACCATC TGCCTGAACG AGCAGTGACT      4440
ATAGGGAGAC CCAAGCTGAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGCCC GGGCTGGTGG      4500
TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTTCT      4560
TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCCGTCA AGCTCTAAAT CGGGGGCTCC      4620
CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC ACCTCGACCC CAAAAAACTT GATTAGGGTG      4680
ATGGTTCACG TAGTGGGCCA TCGCCCTGAT AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT      4740
CCACGTTCTT TAATAGTGGA CTCTTGTTCC AAACTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG      4800
TCTATTCTTT TGATTTATAA GGGATTTTCT CTAGCTAGAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT      4860
AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA      4920
GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC      4980
GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC      5040
AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTGTCCACCT      5100
CGCTGCGCTC GGTCGTTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC      5160
GGTTAGAGAT TTCGATTCCA CCGCCGCCTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG GAATCGTTTT      5220
CCGGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC ATGCTGGAGT TCTTCGCCCA      5280
CCCCAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT      5340
CACAAATAAA GCATTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT      5400
ATCTTATCAT GTCTGTATAC CGTCGACCTC AAGGCTTGAC CGACAATTGC ATGAAGACGC      5460
GTAATCTGCT TAGGGTTAGT TTTACAGGAT GGGGTCTCAT TTATTATTTA CAAATTCACA      5520
TATACAACAC CACCAGATCG CCTGGAGACG CCATCCACGC TGTTTTGACC TCCATAGAAG      5580
ACACCGGGAC CGATCCAGCC TCCGCGGCCG GGAACGGTGC ATTGGAACGC GGATTCCCCG      5640
TGCCAAGAGT GACGTAAGTA CCGCCTATAG AGTCTATAGG CCCACCCCCT TGGCTTCTTA      5700
TGCATGCTAT ACTGTTTTTG GCTTGGGGTC TATACACCCC CGCTTCCTCA TGTTATAGGT      5760
GATGGTATAG CTTAGCCTAT AGGTGTGGGT TATTGACCAT TATTGACCAC TCCCCTATTG      5820
GTGACGATAC TTTCCATTAC TAATCCATAA CATGGCTCTT TGCCACAACT CTCTTTATTG      5880
GCTATATGCC AATACACTGT CCTTCAGAGA CTGACACGGA CGCGTTTTGC GCTGCTTCGC      5940
```

【化３－４】

```
GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA      6000
ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA      6060
AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT      6120
GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG      6180
TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC      6240
GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT      6300
CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG      6360
CAGTACATCA ATGGGCGTGG ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCACCCC      6420
ATTGACGTCA ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCGT      6480
AACAACTCCG CCCCATTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA GGTCTATATA      6540
AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA CCGTCAGATC GCCTGGAGAC GCCATCCACG CTGTTTTGAC      6600
CTCCATAGAA GACACCGGGA CCGATCCAGC CTCCGCGGCC GGGAACGGTG CATTGGAACG      6660
CGGATTCCCC GTGCCAAGAG TGACGTAAGT ACCGCCTATA GAGTCTATAG GCCCACCCCC      6720
TTGGCTTCTT ATGCATGCTA TACTGTTTTT GGCTTGGGGT CTATACACCC CCGCTTCCTC      6780
ATGTTATAGG TGATGGTATA GCTTAGCCTA TAGGTGTGGG TTATTGACCA TTATTGACCA      6840
CTCCCCTATT GGTGACGATA CTTTCCATTA CTAATCCATA ACATGGCTCT TTGCCACAAC      6900
TCTCTTTATT GGCTATATGC CAATACACTG TCCTTCAGAG ACTGACACGG ACTCTGTATT      6960
TTTACAGGAT GGGGTCTCAT TTATTATTTA CAAATTCACA TATACAACAC CACCGTCCCC      7020
AGTGCCCGCA GTTTTTATTA AACATAACGT GGGATCTCCA CGCGAATCTC GGGTACGTGT      7080
TCCGGACATG GGCTCTTCTC CGGTAGCGGC GGAGCTTCTA CATCCGAGCC CTGCTCCCAT      7140
GCCTCCAGCG ACTCATGGTC GCTCGGCAGC TCCTTGCTCC TAACAGTGGA GGCCAGACTT      7200
AGGCACAGCA CGATGCCCAC CACCACCAGT GTGCCGCACA AGGCCGTGGC GGTAGGGTAT      7260
GTGTCTGAAA ATGAGCTCGG GGAGCGGGCT TGCACCGCTG ACGCATTTGG AAGACTTAAG      7320
GCAGCGGCAG AAGAAGATGC AGGCAGCTGA GTTGTTGTGT TCTGATAAGA GTCAGAGGTA      7380
ACTCCCGTTG CGGTGCTGTT AACGGTGGAG GGCAGTGTAG TCTGAGCAGT ACTCGTTGCT      7440
GCCGCGCGCG CCACCAGACA TAATAGCTGA CAGACTAACA GACTGTTCCT TTCCATGGGT      7500
CTTTTCTGCA GTCACCGTCC TTGACACGAA GCTTGCCACC ATGAATAAGC TGCTGTGCTG      7560
TGCCCTCGTG TTTCTCGATA TAAGCATTAA GTGGACTACC CAGGAGACAT TCCCTCCTAA      7620
GTATCTGCAC TATGACGAGG AGACAAGCCA TCAGCTGCTG TGCGATAAGT GTCCTCCTGG      7680
GACCTATCTC AAACAACATT GTACAGCCAA ATGGAAGACA GTCTGCGCTC CATGTCCTGA      7740
CCACTACTAC ACCGACTCTT GGCATACTAG CGACGAATGT CTGTATTGTT CACCCGTGTG      7800
CAAGGAGCTG CAATACGTGA AACAGGAATG CAATAGGACA CATAACCGCG TGTGTGAATG      7860
CAAAGAGGGC AGGTATCTGG AGATCGAATT TTGTCTGAAG CACCGGAGCT GCCCACCCGG      7920
CTTTGGAGTG GTCCAGGCCG GGACTCCCGA GAGAAACACT GTGTGCAAAA GATGCCCAGA      7980
CGGATTCTTT TCAAACGAGA CATCTTCTAA GGCACCATGT CGGAAGCACA CTAACTGTTC      8040
CGTCTTTGGG CTGCTGCTCA CCCAGAAGGG CAATGCCACC CACGATAATA TTTGCTCCGG      8100
AAACTCCGAA TCCACCCAAA AGTGCGGGAT AGATGTTACC CTCTGCGAAG AGGCATTCTT      8160
CCGCTTCGCT GTTCCTACCA AGTTCGACAA AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCTCC      8220
```

【化３－５】

```
GGAACTCCTG GGCGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT      8280
GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA      8340
GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG      8400
GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA      8460
CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT      8520
CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCCTGCC      8580
CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT      8640
CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA      8700
GACCACGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT      8760
GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT      8820
GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATAAT A               8871
```

【００３９】

ある面では、本発明は、場合によりフレキシブルリンカーを介して連結されている、ヒトOPGの先頭２１５個のアミノ酸、続いてヒトＩｇガンマ－１のＦｃ部分の２２７個のアミノ酸を含むポリペプチドの産生のための哺乳動物発現系を提供する。本発明の発現系は、場合によりフレキシブルリンカーを介して連結されている、ヒトOPGの先頭２１５個のアミノ酸とそれに続くヒトＩｇガンマ－１のＦｃ部分の２２７個のアミノ酸を含むポリペプチドの高発現のための組換え哺乳動物発現プラスミドを有する哺乳動物細胞を含む。

【００４０】

例示的な態様では、本発明の哺乳動物発現系は、配列番号３のヌクレオチド配列を含むプラスミドを有するチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-K1）を含む。

【００４１】

ある面では、本発明は、骨吸収または骨リモデリングに関連する障害を有する哺乳動物の治療法を提供する。

【実施例】

【００４２】

実施例

以下の実施例は、本発明の上記の面および他の面を説明する。これらの非限定的な例は、本明細書で特許請求される化合物、組成物、物、装置、および／または方法がどのように作製および評価されるかについての例示的態様を当業者に提供するために示される。この実施例は、本発明の単なる例示であることが意図されており、発明者が本発明と見なす範囲を限定することを意図するものではない。数値（例えば、量、温度など）に関する正確性を確保するための努力がなされているが、いくつかの誤差および偏差が考慮されるべきである。

【００４３】

実施例１：本発明のポリペプチドの調製

配列番号１のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを、当技術分野で公知の、およびＰＣＴ公開ＷＯ２０１３／１４７８９９に記載されている、分子生物学、細胞培養およびタンパク質生化学技術を用いてCHO-K1で発現させた。実質的には、ポリペプチドを発現するCHO-K1細胞を採取し、十分に確立されたプロトコールを利用して溶解した。細胞溶解物清澄化の後、発現されたhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを含有する上清を、まず最初にプロテインＡアフィニティーカラムに適用した。ｐＨ調整されたプロテインＡカラム溶出液を、Q Sepharose樹脂を利用する陰イオン交換クロマトグラフィー（AIEX）によってさらに精製した。AIEXフロースルーは、サイズ排除HPLC（SEC-HPLC）、SDS-PAGEおよび他の分析技術によって適宜分析した。

【００４４】

その後の研究のために、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを含む治療用組成物を、４ｍＬ中に４０ｍｇのhOPG-hIgG1-Fcを含み、１％スクロース、１００ｍＭ塩化ナトリウム、２０ｍＭ　Ｌ－アルギニン塩酸塩および２５ｍＭのリン酸ナトリウム（pH6.3）も含むように剤形化した。単一バイアルは、４ｍＬの容量中に約４０ｍｇのhIgG1-Fcポリペプチドを含有する。したがって、バイアル中のタンパク質濃度は１０±１ｍｇ／ｍＬである。

【００４５】

実施例２：表面プラズモン共鳴(SPR)分析を使用した、RANKLへの親和性結合についての本発明のポリペプチドの評価。

核因子κ-Bリガンドの組換え可溶性ヒト受容体活性化因子（rshRANKL）への配列番号１の調製されたhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの結合親和性を、特別に設計された表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイを用いて測定した。このアッセイにおいて、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドは、組換えタンパク質によってSPRセンサー表面上に捕捉された。異なる濃度のrshRANKLの溶液をセンサー表面上に分配し、会合および解離の動力学をモニターした。親和性は、データに１：１ラングミュア型結合モデルを適合させることによって計算される。

【００４６】

材料、試薬および装置：

Biacore CM5センサーチップ（GE Healthcare）；アミンカップリングキット（GE Healthcare）；50mM水酸化ナトリウム（GE Healthcare）；10mM NaAcetate PH4.5（GE Healthcare）；Surfactance P20（GE Healthcare）；グリシン（Sigma-Aldrich）；１０×PBS緩衝液（GE Healthcare）

バッファー：

ワーキングバッファー：PBS + 0.05% Surfactance P20（pH7.26）

再生バッファー：10mMグリシン緩衝液5.4ml + 10mMグリシン緩衝液（pH1.7）4.6ml

材料：

デノスマブ（Prolia、市販品、Amgen）濃度60mg／mL

実施例１のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド調製物

rshRANKL濃度0.76mg／mL（13μM）

装置：

Biacore X100装置（GE Healthcare）

Biacore X100評価ソフトウェアV2.0.1（GE Healthcare）。

【００４７】

手順：

組換えプロテインＡを、10mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）を用いて0.025mg／mlの終濃度まで希釈した。プロテインＡを、フローセル１－２上に、カップリングキットおよび以下のパラメーターを用いて固定化した：a）１：１ EDC：NHS；b）10μL／分の10mM酢酸ナトリウム（pH4.5）中の希釈されたプロテインＡの５分間注入；c）１Mエタノールアミン（pH8.5）の７分間注入。rshRANKL（MW 57.9kDa）を、BIAcoreワーキングバッファーで所望の濃度に希釈した。親和性測定のために、５つの異なるrshRANKL希釈液を使用した：１．０４１５ｎＭ、２．０８３ｎＭ、４．１６６ｎＭ、８．３３３ｎＭ、１６．６６６ｎＭ。デノスマブ親和性測定には、６つの異なるrshRANKL希釈液を用いた：０．７３５９ｎＭ、１．４７１９ｎＭ、２．９４３７５ｎＭ、５．８８７５ｎＭ、１１．７７５ｎＭ、２３．５５ｎＭ。デノスマブを、BIAcoreワーキングバッファーを用いて０．８μＭの最終濃度まで希釈した。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドサンプルを、BIAcoreワーキングバッファーを用いて終濃度３７nMに希釈した。

【００４８】

分析プロトコール：

アッセイは製造業者のプロトコールに従って行った。サンプルコンパートメント温度は２５℃であった。データ収集速度－１Hz；流速－３０μL／分；5つの異なる濃度のrshRANKLをhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド評価のために使用した（４．１６６ｎＭ希釈を２回測定

した）。６つの異なる濃度のrshRANKLリガンドをデノスマブ評価に使用した。すべての測定を以下のように行った：デノスマブ／hOPG-hIgG1-Fc捕捉時間　１８０秒の接触；rshRANKLの捕捉時間、１８０秒の接触；ワーキングバッファーを用いた解離、３６００秒；再生バッファーを用いた再生、７０秒。

【００４９】

Biacore X100評価ソフトウェアを、各サンプルについて動力学的会合定数（k_a）および解離定数（k_d）、平衡解離定数（K_D）および最大RANKL結合レベル（R_{max}）を評価するために使用する。モデルパラメータは、１：１ラングミュア型結合モデルをデータに適合させることによって、個々のサンプルについて個別に評価される。

【００５０】

異なるRANKL濃度におけるデノスマブの会合および解離曲線を図１に示す。各曲線の相関データを表１に示す。Biacore X100評価ソフトウェアを用いて評価したデノスマブ－RANKL結合のモデルパラメータを、表２に示す。

【００５１】

RANKLに結合する抗RANKL抗体デノスマブの親和性（K_D）は、２．６×１０$^{-11}$Mであり、製造業者から報告されたデータと一致している。

【００５２】

表１：デノスマブ－rshRANKL結合の相関データ

【表１】

曲線	濃度 (M)	流速 (ul/分)	kt (RU/Ms)	RI (RU)
サイクル: 5 0.7359 nM	7.359E-10	30	1.07346E+18	2.729222012
サイクル: 6 1.4719 nM	1.4719E-09	30	1.07346E+18	4.866918331
サイクル:7 2.94375 nM	2.94375E-09	30	1.07346E+18	6.830413213
サイクル: 8 5.8875 nM	5.8875E-09	30	1.07346E+18	5.581231192
サイクル: 9 11.775 nM	1.1775E-08	30	1.07346E+18	2.692233789
サイクル: 10 23.55 nM	2.355E-08	30	1.07346E+18	-1.728466535

【００５３】

表２：デノスマブ－RANKL結合の評価に用いたモデルパラメータ

【表２】

k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max} (RU)	t_c	Chi² (RU²)	U 値
235360.1515	6.21706E-06	2.64151E-11	562.403892	3.45471E+17	8.62705	11.64904

【００５４】

異なるrshRANKL濃度でのhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの会合および解離曲線を図２に示す。各曲線の相関データを表３に示す。Biacore X100評価ソフトウェアを用いて評価したhOPG-hIgG1-Fc-RANKL結合のモデルパラメータを、表４に示す。

【００５５】

RANKLへのhOPG-hIgG1-Ｆｃ結合の親和性(K_D)は、４．８５×１０$^{-13}$Mである。

【００５６】

表３：hOPG-hIgG1-Fc-RANKL結合の各曲線の相関データ

【表３】

曲線	Rmax (RU)	濃度 (M)	流速 (ul/分)	RI (RU)	kt (RU/Ms)
サイクル: 5 1.0415 nM	44.96516	1.04E-09	30	-1.0584	4.33E+08
サイクル: 6 2.083 nM	87.28024	2.08E-09	30	-6.8384	4.33E+08
サイクル: 7 4.166 nM	205.2188	4.17E-09	30	-23.1182	4.33E+08
サイクル: 8 8.333 nM	567.9522	8.33E-09	30	-29.2618	4.33E+08
サイクル: 9 16.666 nM	639.3375	1.67E-08	30	-4.20587	4.33E+08
サイクル: 11 4.166 nM	218.8427	4.17E-09	30	-20.7052	4.33E+08

【００５７】

表４：Biacore X100によって評価されたhOPG-hIgG1-Fc-RANKL結合のモデルパラメータ

【表４】

k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t_c	Chi² (RU²)	U値
13476795.16	6.54E-06	4.85E-13	1.39E+08	5.541974	5.30225

【００５８】

したがって、rhsRANKLへの配列番号１のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの結合親和性(K_D)は、約４．９×１０$^{-13}$Mであると評価され、それは、市販のデノスマブ（それは本質的に同様の実験条件下で約２．６×１０$^{-11}$Mであると評価された）のそれと比較して、およそ５０倍高い。

【００５９】

実施例３：hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの製剤安定性試験

配列番号１のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを、実質的に上記の通り発現させ、精製した。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの長期安定性試験は、２－８℃での生成物の安定性を評価するために行った。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの加速安定性試験を４０℃で行い、異なる組成の製剤バッファー中の製剤安定性を評価した。ポリペプチドの安定性をSEC HPLCで分析した。SEC HPLCクロマトグラムの統合を行い、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチド単量体、凝集物および分解産物を評価し、タンパク質組成の変化をモニターした。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドをスクリューキャップで蓋をしたバイアルに等分した。アリコートを所要時間の間、指定温度で暗所に保存した。

【００６０】

材料および装置：

使用したすべての試薬は、少なくともHPLC等級であった：Milli-Q 水（または、等価物）；塩化ナトリウム（JT Baker）；リン酸ナトリウム二塩基、７水和物（$Na_2HPO_4.7H_2O$、JT Baker）または無水リン酸ナトリウム二塩基（Na_2HPO_4、JT Baker）；6N塩酸（JT Baker）；水酸化ナトリウム6N NaOH（BDH）；アジ化ナトリウム（Sigma Aldrich）；；メタノール（JT Baker）；rhsRANKL（Alphamab, Inc.）；ヤギ抗ヒトIgG：HRPコンジュゲート（Perkin-Elmer）。

【００６１】

pHメーター（Corning Pinnacle 542）；分析天びん（Mettler Toledo XS603S）；PDAおよびEmpowerソフトウェアを備えたWaters HPLCシステム；YMC-Pack Diol 300、6.0mm ID×30cm（YMCカタログ番号DL06S053006WT）；G2000 SWxl、7.5mm×300mm（TOSOH Bioscience）；TSKガードSW、7.5mm×75mm（TOSOH Bioscience）；2μmフリットを有するインラインフィルター（VWRカタログ番号21511-442）；交換用2μmフリット（VWRカタログ番号21511-423）；フィルター、PES、1000mL（Nalgene、カタログ番号567-0020）；トータルリカバリーバイアル、PTFE／シリコンセプタム（Waters）付きスクリュートップ12 x 32 mmキ

ャップ；結合したプレスリット付きPTFE／シリコンセプタム（Waters）を備えたキャップ／セプタム 12 x 32スクリューネック。

【００６２】

バッファー：

移動相バッファー：

YMCパック・ジオール300カラム用の、100mM リン酸ナトリウム、200mM NaCl pH 7.0(PBS) 20mM リン酸ナトリウム、300mM NaCl（pH7.4バッファー）。G2000SWxlカラム用にろ過および脱気した。

以下の製剤バッファーを調製した：

１．25mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL スクロース、pH 6.3

２．25mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL スクロース、pH 6.8

３．20mMヒスチジン、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL マンニトール、pH 6.8

４．20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、pH 6.8

５．20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、0.1mg/mL メチオニン、pH 6.8

６．20mMヒスチジン、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL マンニトール、pH 6.3

７．20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、pH 6.3

８．20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、0.1mg/mLのメチオニン、pH 6.3。

【００６３】

手順：

１mg/mlまたは２mg/mLのタンパク質濃度を達成するために、サンプルを移動相で希釈した。

クロマトグラフィー・パラメーター：

流量：０．５ｍｌ／分

カラム温度：２５±３℃

オートサンプラー温度：５±３℃

注入量：２ｍｇ／ｍＬのポリペプチド濃度を有するサンプルについて１５μｌ

１ｍｇ／ｍＬのポリペプチド濃度を有するサンプルについて２５μｌ

検出器波長：２ｍｇ／ｍＬのポリペプチド濃度を有するサンプルについて２８０ｎｍ

１ｍｇ／ｍＬのポリペプチド濃度を有するサンプルについて２１４ｎｍ

泳動時間：３５分。

【００６４】

hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの個々の調製物の２つのロットを、両方とも、25m M リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg／mL スクロース(pH6.3)中で製剤化された約10mg／mlの全タンパク質濃度で、試験した。

【００６５】

hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの２つの異なる調製物ロットについての２－８℃での安定性試験の結果を、以下の表５および表６にまとめる。

【００６６】

表５：安定性試験時間点でのhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド組成物

【表５】

サンプル	組成	時間点（日）		
		0	67	176
ロット番号１	単量体 (%)	94.3	94.4	93.9
	凝集物 (%)	0.6	1.3	1.3
	分解産物 (%)	5.1	4.3	4.8

【００６７】

表６：安定性試験時間点でのhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド組成物

【表６】

サンプル	組成	時間点			
		1日	4 週	9 週	12 週
ロット番号２	単量体 (%)	98.1	97.2	97.2	97.1
	凝集物 (%)	0.38	0.43	0.2	0.56
	分解産物 (%)	1.5	2.4	2.6	2.4

【００６８】

調製物ロット番号２を、種々の組成の製剤バッファー中、４０℃での加速安定性試験を行った。ロット番号２の調製物（25mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg／mL スクロース、pH6.3）の製剤バッファーを、上に列記されている製剤バッファーと交換した。加速安定性試験の結果を以下の表７にまとめる。

【００６９】

表７：加速安定性試験時間点でのhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド組成物(製剤バッファーＦ１～Ｆ８)

Ｆ１－25mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mLスクロース、pH6.3

【表７－１】

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.6	94.2	91.4	87.3	83.7
	凝集物 (%)	0.8	1.6	3.2	4.9	6.3
	分解産物 (%)	2.6	4.2	5.4	7.8	10.0

Ｆ２－25mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL スクロース、pH 6.8

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.8	92.6	89.1	83.4	83.7
	Aggregates (%)	0.6	2.1	4.1	6.3	6.3
	分解産物 (%)	2.6	5.3	6.8	10.3	10.0

【表７－２】

Ｆ３－20mMヒスチジン、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL マンニトール、pH 6.8

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.6	94.2	91.3	88.3	84.8
	凝集物 (%)	0.6	1.5	2.4	3.2	3.7
	分解産物 (%)	2.8	4.3	6.3	8.5	11.5

【表７－３】

Ｆ４－20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、pH 6.8

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.6	94.3	91.2	88.2	86.4
	凝集物 (%)	0.6	1.6	2.4	3.8	3.8
	分解産物 (%)	2.8	4.1	6.4	8.0	9.8

【表７－４】

Ｆ５－20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、0.1 mg/mL メチオニン、pH 6.8

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.8	94.3	85.8	87.7	86.7
	凝集物 (%)	0.6	1.5	2.1	2.3	3.1
	分解産物 (%)	2.6	4.2	12.1	10.0	10.2

【表７－５】

Ｆ６－20mMヒスチジン、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL マンニトール、pH 6.3

【表７－６】

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.8	94.4	93.4	88.7	88.1
	凝集物 (%)	0.6	1.4	1.9	2.3	2.2
	分解産物 (%)	2.6	4.2	4.7	9.0	9.7

Ｆ７－20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、pH 6.3

【表７－７】

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.8	94.4	93.0	91.2	87.9
	凝集物 (%)	0.6	1.4	1.8	3.0	2.9
	分解産物 (%)	2.6	4.2	5.2	5.8	7.2

Ｆ８－20mMヒスチジン、50mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、25mg/mL マンニトール、0.1 mg/mLのメチオニン、pH 6.3

【表７－８】

サンプル	組成	時間点（日）				
		0	7	14	21	28
ロット番号２	単量体 (%)	96.4	95.0	92.8	91.0	88.6
	凝集物 (%)	0.6	1.3	1.8	2.1	2.0
	分解産物 (%)	3.0	3.7	5.4	6.9	9.4

【００７０】

表７にまとめた結果から明らかなように、製剤バッファー中への10mg／mLまでのマンニトールの添加は、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチド組成物安定性を改善したが、pH6.3から6.8への製剤バッファーのpH上昇ならびにNaCl濃度の変化はどちらも、製品の安定性に影響を及ぼさなかった。

【００７１】

ロット番号２調製物の安定性を、室温（RT）でも試験した。調製物を、それぞれ０．６、１．２、１．８ｍｇ／ｍｌの総タンパク質濃度を有する３つのサンプルに、０．９％NaClで希釈した。サンプルを２４時間室温で保存し、０時間の時点および２４時間の時点で分析した。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチド組成物の安定性をSEC HPLCで分析し、RANKLに結合する対照標準の７０から１３０％の合格基準にあるRANKLへのhOPG-hIgG1-Fcの結合を評価するために、タンパク質組成物およびELISAの整合性をモニターした。この試験結果を表８にまとめる。

【００７２】

表８：RT安定性試験時間点でのhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド組成物

【表８】

	対照 10mg/mL		0.6mg/mL		1.2mg/mL		1.8mg/mL	
	0 時間	24 時間	0 時間	24 時間	0 時間	24 時間	0 時間	24 時間
単量体 (SEC-HPLC)	95.12%	94.63%	94.19%	93.56%	95.08%	94.29%	95.04 %	94.57%
結合活性 (ELISA)	94.9%	-	88.8%	94.10%	89.3%	79.40%	88.6%	115.60%

【００７３】

表８にまとめた結果から明らかな通り、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの10mg／mlストック液を、０．６ｍｇ／ｍｌ、１．２ｍｇ／ｍｌおよび１．８ｍｇ／ｍＬに希釈し、２４時間室温で保存し、そして対照標準と同様の組成の整合性および結合活性を実証した。したがって、データから、薬剤の調製および静脈内投与のための十分な時間の間、再構成後のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド溶液の安定性を確認した。

【００７４】

ロット番号２調製物の２－８℃での長期安定性を試験した。この試験結果を表９にまとめた。

表９：hOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドの２－８℃での長期安定性試験結果

【表９】

アッセイ	試験方法	規格	T = 0	T= 3 か月後	T= 6 か月後
性状	999-GMP-064	透明、無色、可視微粒子なし	透明、無色、可視微粒子なし	透明、無色、可視微粒子なし	透明、無色、可視微粒子なし
pH	999-GMP-017	6.1 - 6.5	6.4	6.4	6.4
A280	774-01-001	9.0 - 11.0 mg/mL	10.1 mg/mL	10.8 mg/mL	10.0 mg/mL
クマシー染色 還元条件下	774-01-004	対照標準と同等	対照標準と同等	対照標準と同等	対照標準と同等
クマシー染色 非還元条件下	774-01-004	対照標準と同等	対照標準と同等	対照標準と同等	対照標準と同等
RankL ELISA	774-01-009	70 - 130%	100%	89%	81%
IEF	774-01-007	FIOバンドのｐｌ範囲および数を報告	16バンド; pI 範囲 6.0-8.0	11バンド; pI 範囲 6.0-7.8	11 バンド pI 範囲 6.0-7.8
SEC-HPLC	774-01-002	≥ 92% 単量体	96% 単量体	97% 単量体	97% 単量体
浸透圧	999-GMP-024	280 - 350 mOsm/kg	298 mOsm/kg	301 mOsm/kg	300 mOsm/kg
エンドトキシン	774-01-028	≤ 0.25 EU/mg	< 0.04 EU/mg	N/A	N/A
バイオバーデン	999-GMP-484	≤ 3 CFU/10mL 汚染微生物なし	< 1 CFU/10mL 汚染微生物なし	N/A	N/A

【００７５】

表８にまとめた結果から明らかなように、25mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mLスクロース、pH6.3中で製剤された配列番号１のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド10mg／mlは、少なくとも６ヶ月間、構造的安定性および特異的活性を維持した。

【００７６】

実施例４：霊長動物におけるhOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドの単回投与薬物動態試験

皮下および静脈内（ボーラス）投与後のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの薬物動態プロファイルおよび最大耐量は、１２匹のカニクイザル（オス６匹とメス６匹）に、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの単回用量を、０．３、３、１０、３０および１００ｍｇ／ｋｇの用量レベルで皮下投与するか、または０．３、３および１０ｍｇ／ｋｇの用量レベルで静脈内

投与して、試験した。静脈内投与は、１mL／ｋｇの液量（dose volume）で行われ、一方、皮下投与は、２mL／ｋｇの液量で行われた。試験物質の濃度は、９．７３ｍｇ／ｍｌであり、より高い用量レベルについて、液量を（動物の重量に基づいて）調整し、目標用量レベル／秒を達成した。

【００７７】

以下のビークルは、必要な用量濃度の試験物質の調製のために使用した。製剤バッファー（１% w/v スクロース、100mM 塩化ナトリウム、20mM L-アルギニン塩酸塩、25mM 重炭酸ナトリウム、最後にpHを6.3に調整）。ビークルを冷蔵貯蔵し、調製後１週間以内に使用した。

【００７８】

動物は、約２－４歳であり、試験開始時に２－４ｋｇ重量であった。動物は、臨床徴候について１日２回観察した。体重は、各用量増加の前に記録した。食餌消費量は、試験中、目視で毎日評価した。血液学および臨床化学の臨床病理検査のための血液サンプルを、試験前および各用量レベル投与の２４時間後に採取した。

【００７９】

動物を、まず、２用量群に割り当て、以下の通り処理した：

【表１０】

投与経路	用量レベル (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	液量 (mL/kg)	動物数	
				オス	メス
皮下投与	0.3	0.3	1	1	1
	3	3	1	1	1
	10	9.73	1	1	1
静脈内(ボーラス)投与	0.3	0.15	2	1	1

【００８０】

次いで、動物に以下のように投与した：

【表１１】

投与経路	用量レベル (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	液量 (mL/kg)	動物数	
				オス	メス
皮下投与	10	4.85	2.06	1*	1*
	30	9.73	3.08	1**	1**
静脈内(ボーラス)投与	3	1.5	2	1*	1*
	10	5	2	1**	1**

*以前に、０．３ｍｇ／ｋｇでhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを投与された動物、**未処理（naive）動物。

【００８１】

２匹の動物への追加の皮下投与を、肝酵素活性（すなわち、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼおよび乳酸脱水素酵素）を評価するために行い、投薬は以下のように行った：

【表１２】

投与経路	用量レベル (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	液量 (mL/kg)	動物数	
				オス	メス
皮下投与	10	4.85	2.06	1***	1***

***以前に、３．０ｍｇ／ｋｇでhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを皮下投与された動物。

【００８２】

２匹の動物は、２週間投与後の観察期間に続いて１００ｍｇ／ｋｇの単回皮下注射を受けた。血液サンプルを、肝酵素活性のために収集した。

【表１３】

投与経路	用量レベル (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	液量 (mL/kg)	動物数	
				オス	メス
皮下投与	100	9.73	10.3	1	1

【００８３】

両動物には、前もって、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを、それぞれ、皮下投与で０．３および１０ｍｇ／ｋｇ、ならびに静脈内投与で、０．３および３ｍｇ／ｋｇ投与した。

【００８４】

薬物動態学的研究のための血液サンプルを、各用量漸増で指定された時間点で得た。

【００８５】

hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの血漿レベルでの薬物動態学的分析を、WinNonlin（登録商標）用のフェニックス(商標)（version 6.1、Pharsight Corporation）を用いて、非コンパートメント法を用いて行った。C_0(外挿により求めた静脈内投与時（Ｔ＝０）の血漿中濃度)、Cmax(皮下投与についての最高血漿中濃度)は、観察された個体値から得られた。AUC_{last}(最後のデータ点までの曲線下面積）を、対数線形回帰を組み合わせて決定した。

【００８６】

ＰＫデータからの結果は、hOPG-hIgG1-ＦｃポリペプチドのC_{max}が、０．３、３、１０および３０ｍｇ／ｋｇの用量レベルでの皮下投与の約６－８時間後、ならびに０．３、３および１０ｍｇ／ｋｇの用量レベルでの静脈内注射の約１時間後であることを示した。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドのクリアランスは、静脈内投与および皮下投与の両方について、投与の約１６８時間後であった。皮下投与については、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドは、低用量(0.3mg／kg)で、および動物0590(3mg／kg)についてそれぞれ観察された、１時間および２時間のT_{lag}により示された通り、必ずしも直ぐに吸収されなかった。T_{half}値は、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの排出が、３および１０ｍｇ／ｋｇの投与量の値に基づいて、それぞれ静脈内投与および皮下投与の約５５時間および４５時間のT_{half}と比較的遅かったことを示した。静脈内投与について、T_{half}は、２７．５時間から５７．８時間の範囲であり、皮下投与について、３５．５時間から５３．３時間の範囲であった。排出速度は、投与量（dose rate）に付随する増加を示さなかった。排出は、両経路について同様であった。静脈内投与および皮下投与について、ＣｌおよびＶ$_d$は、投与量に関係なく類似していた。静脈内投与については、ＣｌおよびＶ$_d$はそれぞれ、０．７５から１．２２ｍＬ／時間／ｋｇの範囲および４８．３から７６．６ｍＬ／ｋｇの範囲であった。対応する範囲は、皮下投与について、０．９７から１．６９ｍＬ／時間／ｋｇの範囲および６５．３から９４．６ｍＬ／ｋｇの範囲であった。ＣｌおよびＶ$_d$は、用量の増加に伴っ

て増加しなかった。これらの結果は、T_{half}、ＣｌおよびＶ$_d$が投与量に依存しないことを示した。hOPG-hIgG1-Fcの暴露の線形性は、線形回帰によるＣmaxおよびＡＵＣlastから、皮下注射についてのみ図示により決定され、これらを図４に示す。暴露は直線的に増加し、AUC_{last}およびC_{max}それぞれについて、R^2＝０．９６および０．９８であった。

【００８７】

皮下投与について、C_{max}値に基づき、用量比例性が示されることが明らかとなった（図５）。投与量によって補正された平均Ｃmaxは、０．３、３、１０および３０ｍｇ／ｋｇ用量のそれぞれについて、６４１０、１１３０９、１０４０９および１１７３９（ｎｇ／ｍＬ）／（ｍｇ／ｋｇ）であった。用量比例は、３～０．３ｍｇ／ｋｇの用量で明確に実証された。暴露は、他の３用量と０．３ｍｇ／ｋｇの用量との比較で比例以上に増加した。実際に、０．３および３ｍｇ／ｋｇ間で１０倍増加、０．３および１０ｍｇ／ｋｇ間で、３３．３倍増加、０．３および３０ｍｇ／ｋｇ間で１００倍増加し、Ｃmaxはそれぞれ１７．６、５４．１および１８３．１倍増加した。AUC_{last}に対する対応する値は、それぞれ８２．３、２４９．５および１０９５．１であって、曝露が用量比よりも約１０倍以上で増加していることを示した。

【００８８】

３および１０ｍｇ／ｋｇ間で、相対的な用量比例性は、C_{max}／ＤおよびＡＵＣ$_{last}$／Ｄに基づいて示され、理論的な用量比に近づけた用量比計算によって確認された。

【００８９】

静脈内投与について、暴露は、用量比例よりもわずかに増加し、用量の３．３倍の増加について、ＡＵＣ$_{last}$およびC_{max}は４．３および４．１倍それぞれ増加した。

【００９０】

したがって、ＡＵＣ$_{last}$およびC_{max}は、３から３０ｍｇ／ｋｇまでのみで比較的用量に比例する暴露につれて直線的に増加した(R^2　１．０)。これらの結果は、全身暴露が、３から３０ｍｇ／ｋｇまでの漸増用量について皮下投与の後にほぼ比例して増加したことを示した。

【００９１】

hOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドの生物学的利用能は、３および１０ｍｇ／ｋｇで得られた平均値を用いて評価され、３および１０ｍｇ／ｋｇでそれぞれ、８８．６％および５９．２％に相当した。hOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドは、１０ｍｇ／ｋｇ（５９．２％）と比較して３ｍｇ／ｋｇ（８８．６％）でより良好な生物学的利用能を有することが明らかとなった。

【００９２】

したがって、本試験の結果から明らかなように、全ての動物は評価された両投与経路およびすべての投与量でhOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドに暴露された。皮下投与後、hOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドへの全身暴露(ＡＵＣ$_{last}$およびC_{max})は、３から３０ｍｇ／ｋｇのみで比較的用量に比例する暴露につれて直線的に増加した。排出速度は、用量漸増に影響を受けず、両経路で類似していた。いかなる投与経路であっても、ＣＩおよびＶ$_d$は投与量に無関係に類似した。この結果は、T_{half}、ＣｌおよびVdが投与量に依存しないことを示した。この結果は、hOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドが、１０ｍｇ／ｋｇ（５９．２％）と比較して３ｍｇ／ｋｇ（８８．６％）でより良好な生物学的利用能を有したことを示唆する。

【００９３】

霊長動物における単回皮下投与および静脈内投与後のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの平均血漿薬物動態パラメータを、以下の表９にまとめる。

【００９４】

表９：霊長動物における単回皮下投与および静脈内投与後のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの平均血漿薬物動態パラメータのまとめ

【表１４】

種	経路	用量	AUC (ng.h/mL)	Cmax (ng/mL)	$T_{1/2}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V (mL/kg)
カニクイザル	SC	0.3mg/kg	27651	1923	NC*	NC	NC
		3mg/kg	2276384	33928	48.2	1.25	84.5
		10mg/kg	6899231	104091	38.9	1.38	76.0
		30mg/kg	30278949	352175	NC	NC	NC
カニクイザル	IV	3mg/kg	2647530	112132	42.6	1.07	62.4
		10mg/kg	11256849	460319	54.9	0.78	61.5

* NC - 計算しない

【００９５】

実施例５：霊長動物におけるhOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドの反復投与の薬物動態試験

反復投与の薬物動態学的分析は、カニクイザルの薬物毒性試験（toxicokinetic）中に完了し、ここで、メインおよびリカバリグループからのそれぞれ３匹のオスおよび３匹のメスの４つのグループを、０、０．３、３および１０ｍｇ／ｋｇの濃度での皮下注射を２週間連続で１週間に２回行うことで処理した（１群当たりｎ＝雌雄各３匹）。薬物毒性解析は、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドを投与された動物でのみ行われた。

【００９６】

血漿レベルでの薬物毒性解析は、WinNonlin(登録商標)用のフェニックス(商標)（version 6.1、pharsight Corporation）を用いて、非コンパートメント法(non-compartmental method)を用いて行った（反応速度のそれぞれの日について、１日目と１３日目）。したがって、薬物動態パラメータを、それぞれ１日目および１３日目の投与後に比較した。

【００９７】

本試験では、以下のことを実証した。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドが、対照グループ（グループ１）の１匹のオスおよび１匹のメスで測定された場合でも、このグループで定量可能な濃度は検出されなかった。全ての動物を、０．３、３および１０ｍｇ／ｋｇの用量で、２週間の間、週２回、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドに曝露した。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドへの全身曝露（平均AUC_{72}および平均C_{max}）は、オスおよびメスの両方で用量漸増とともに増加した。hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの中程度の蓄積は、２週間の投与後に観察された。投与期間は、投与量レベルに依存しなかった。C_{max}およびAUC_{72}は、１３日目と１日目のAUC_{72}の比によって示されるように、オスとメスの両方で、すべての用量レベルでの反復投与後に増加した。この比は、０．２８から２．５０の範囲であって、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの中程度の血漿中蓄積を確認した。蓄積は、投与した用量レベルに伴い増加した。性別の効果は、個体内変動よりも高くなかった。明確な性差は結論付けられず、オスとメスとの間に差はなかったと考えられる。性差に関して、暴露は、０．３から１０ｍｇ／ｋｇの異なる用量に亘ってオスとメスの両方で類似していた。１日目および１３日目での、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの全身血漿曝露は、オス、メス共、０．３および１０ｍｇ／ｋｇの間で用量に比例する以上に増加した。用量比例は、１日目を除き、メスついて、AUC_{72}に基づいて中用量から低用量の間で、およびオスについて、C_{max}に基づき、高用量から低用量の間で、認められなかった。１３日目に、血漿曝露の増加は、高レベルで標的用量比よりも少なくとも５倍高かった。

【００９８】

霊長動物における反復用量皮下投与後の、hOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの平均血漿薬物動態パラメータを、以下の表１０にまとめる。

【００９９】
表１０：２週間、週２回の皮下投与後のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドについて、オスおよびメスのカニクイザルにおける平均血漿薬物動態パラメータのまとめ（用量群あたり、N＝雌雄各３）
【表１５】

用量 (mg/kg)	0.3		3		10	
時	1日目					
性別	オス	メス	オス	メス	オス	メス
AUC_{72} (ng.h/mL)	452067	235964	2673970	3203140	14821856	15224149
C_{max} (ng/mL)	14197	5365	45623	52601	233410	250589
T_{max} (h)	38.00	8.00	24.00	24.00	72.00	24.00
AUC_{72} (M/F)	1.92		0.83		0.97	
C_{max} (M/F)	2.65		0.87		0.93	
用量比	10 (I/L)		3.33 (H/I)		33.3 (H/L)	
AUC_{72} 比	5.91	13.57	5.54	4.75	32.8	64.5
C_{max} 比	3.21	9.80	5.12	4.76	16.44	46.71
時	2週間（13日目）					
AUC_{72} (ng.h/mL)	189783	210980	4638633	6785492	33486023	35935204
C_{max} (ng/mL)	4262	3965	74853	110957	547783	606545
T_{max} (h)	8.00	8.00	24.00	8.00	8.00	24.00
用量比	10 (I/L)		3.33 (H/I)		33.3 (H/L)	
AUC_{72} 比	24.44	32.16	7.22	5.30	176.4	170.3
C_{max} 比	17.56	27.98	7.32	5.47	128.51	152.96
R_{ac} (13日目/1日目)	0.28	1.07	1.76	2.11	2.50	2.39

【０１００】
実施例６：ヒトにおけるhOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドの単回投与薬物動態試験
皮下投与後の配列番号１のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの薬物動態プロファイルを、１０ｍｇ、３０ｍｇおよび６０ｍｇの用量レベルで皮下投与によりhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの単回投与を受けた健康な男性ボランティア（年齢１９から３９歳）において検討した。使用したhOPG-hIgG1-Fcポリペプチド製剤は、25mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl、25mM L-アルギニンHCl、10mg/mL スクロース、pH 6.3中で製剤された総タンパク質濃度約１０ｍｇ／ｍｌであった。試験した３用量についての投与後の種々の時点でのhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの血中濃度を、表１１から１３にまとめる。この結果は、ヒト対象において、全身循環における試験下の薬剤の実質的な皮下投与後の生物学的利用能を示している。
【０１０１】
表１１：１０ｍｇ用量の単回皮下投与後の健康なボランティアにおけるhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの血中濃度

【表１６】

時間点（時）	対象IDあたりの hOPG-hIgG1-Fc ポリペプチド(ng/mL)							
	Ctrl 1	Ctrl 2	A**	B	C	D	E	F
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	52.6
4	0	0	0	18.1	24.7	0	32.1	98.2
8	0	0	0	37.1	69.3	17.5	196.4	120.5
9	0	0	0	32.5	72.3	17.8	198.3	116.6
10	0	0	0	31.6	86.3	22.9	215.2	121.7
11	0	0	0	28.7	76.2	18.4	221.9	113.7
12	0	0	0	35.7	78.4	23.1	234.4	97.0
16	0	0	0	29.5	0	64.9	220.5	91.6
24	0	0	0	24.5	105.5	35.5	215.9	95.3
48	0	0	0	52.5	97.1	48.2	167.4	123.2
168	0	0	0	36.1	53.4	49.9	67.0	84.4
288	0	0	0	26.6	26.0	28.6	35.8	49.1
480	0	0	0	15.2	0	0	0	45.5
648	0	0	0	0	0	0	0	40.0
	* 0.0 は、得られた値が定量(1.683ng/mL)の下限以下であることを示す ** 値は、全ての時間点で得られたが、全て定量(1.683ng/mL)の下限以下であって、信頼性のある定量はできなかった。							

【０１０２】

表１２：３０ｍｇ用量の単回皮下投与後の健康なボランティアにおけるhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの血中濃度

【表１７】

時間点（時）	対象IDあたりの hOPG-hIgG1-Fc ポリペプチド (ng/mL)							
	Ctrl 1	Ctrl 2	A	B	C	D	E	F
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	24.8	17.7	34.1	0	0
2	0	0	0	67.2	340.4	37.7	17.6	0
4	0	0	44.6	160.2	1044.2	116.7	51.5	74.2
8	0	0	123.2	225.4	1940.2	288.4	92.2	187.0
9	0	0	143.3	198.9	2057.3	279.2	76.9	175.1
10	0	0	163.1	214.2	2085.1	352.7	93.2	221.6
11	0	0	167.6	194.4	2052.0	303.8	84.1	205.2
12	0	0	173.1	178.9	2331.4	353.6	77.8	205.7
16	0	0	196.6	156.9	2466.4	298.3	81.1	181.4
24	0	0	103.9	165.4	2321.4	262.6	109.4	171.3
48	0	0	168.1	164.3	1883.5	224.1	176.6	164.1
168	0	0	69.9	61.9	264.9	36.6	100.5	116.0
288	0	0	40.2	0	54.6	30.3	44.0	59.1
480	0	0	0	0	24.5	0	22.6	33.1
648	0	0	0	0	17.0	45.5	0	19.1
	* 0.0 は、得られた値が定量(1.683ng/mL)の下限以下であることを示す							

【０１０３】

表１３：６０ｍｇ用量の単回皮下投与後の健康なボランティアにおけるhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドの血中濃度

【表１８】

時間点（時）	対象IDあたりの hOPG-hIgG1-Fc ポリペプチド (ng/mL)							
	Ctrl1	Ctrl 2	A	B	C	D	E	F
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	83.6	0	0	0	0
2	0	0	191.5	836.0	56.5	98.7	0	66.7
4	0	0	879.5	1818.6	222.9	370.8	276.3	275.7
8	0	0	1505.1	2963.0	376.7	567.1	579.3	686.7
9	0	0	1392.3	2744.2	365.4	632.7	719.7	739.3
10	0	0	1605.2	3054.6	450.6	720.5	732.5	1048.0
11	0	0	1672.7	3231.3	453.9	683.7	717.3	1028.3
12	0	0	1987.3	3293.0	434.6	708.4	700.6	1026.4
16	0	0	1860.1	3226.6	368.8	903.4	749.4	1180.0
24	0	0	1749.6	3252.6	547.9	834.8	718.1	1508.0
48	0	0	1849.4	3041.6	971.8	1119.4	1026.1	1766.0
168	0	0	523.7	1015.2	409.6	753.5	444.6	1804.0
288	0	0	251.1	339.6	113.0	174.7	182.3	575.5
480	0	0	81.5	0	41.7	62.7	84.1	321.5
648	0	0	43.5	0	37.6	0	71.1	180.6
	* 0.0 は、得られた値が定量(1.683ng/mL)の下限以下であることを示す							

【０１０４】

実施例７：hOPG-hIgG1-Ｆｃポリペプチドのヒト組織結合特性試験

この免疫組織化学（ＩＨＣ）試験の目的は、配列番号１のhOPG-hIgG1-Fcポリペプチドについて、組織結合特性を決定すること、およびその結合パターンを市販療（Prolia）と比較することである。市販のＴＮＦ－α結合治療薬エタネルセプト（Enbral）をアイソタイプ対照として使用した。

【０１０５】

方法

滴定試験を、最小のバックグラウンドおよびシグナルの最大検出をもたらす濃度を確立するために、３種のタンパク質治療薬、hOPG-hIgG1-FC-FITC、PROLIAおよびENBREL（Covance社によって、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）標識された）を用いて行った。LifeSpanにより供給された新鮮凍結ヒト組織を、２０μgの／ｍｌ、１０μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌおよび２．５μｇ／ｍｌに連続希釈した。加えて、ENBRELは、１．２５μｇ／ｍｌ、０．６μｇ／ｍｌおよび０．３μｇ／ｍｌでさらに滴定した。hOPG-hIgG1-FC-FITC、PROLIA-FITC、およびアイソタイプ対照治療薬ENBREL-FITCを、一次結合試薬として使用し

、主要な検出システムは、抗FITCマウス二次抗体（Sigma-Aldrich社、カタログ番号F5636）、次いで抗マウス二次抗体（Vector、BA-2000）、およびRed基質キット（Vector、SK-5100）を含むABC-APキット（AP=アルカリホスファターゼ二次抗体、Vector、AK-5000）から構成され、フクシア（fuchsia）着色された蓄積物（deposit）を生成するために使用された。組織は、組織抗原が保存され、免疫組織化学的分析のためにアクセス可能であったことを確認するための陽性対照抗体（ＣＤ３１およびビメンチン）で染色した。ＣＤ３１およびビメンチン染色で陽性であった組織のみを、残りの試験ために選択した。陰性対照は、一次試薬の不在下、または一次試薬および抗FITC二次抗体の不存在下（抗マウス三次抗体および全ての場合の全ての他の下流の試薬を用いて）で隣接するセクションに全体的免疫組織化学の手順を実行することからなる。スライドは病理学者によって解釈され、各試薬は、固有のシグナルの存在、バックグラウンドのレベル、および文献に記載された発現結果との一致を評価された。染色強度は、０～４のスケールで記録した（０＝陰性、１＝赤みがかった、２＝かすかな赤色、３＝中程度の赤色、４＝強い赤色）。スライドは、ニコン顕微鏡に接続されたDVCの1310Cデジタルカメラで撮像した。試験結果を以下の表１４にまとめる。

【０１０６】

表１４：ヒト組織におけるＩＨＣ試験の結果

【表１９】

サンプル	性別	年齢	組織	病理学	タイプ	CD31/ビメンチンバリデーション	細胞型	hOPG-hIgG1 5 ug/ml IHCスコア	PROLIA 2.5 ug/ml IHCスコア	ENBREL 1.25 ug/ml IHCスコア	一次抗体なし二次抗体
1	M	70	骨髄	正常	正常	P	赤血球前駆細胞	0	0	0	0
							骨髄系前駆細胞	2	2-3	0-1	0
							巨核細胞	2-3	3	2-3	1
							マクロファージ	1-2	2-3	2	0
							顆粒球	3	3-4	0-1	0
2	M	58	骨髄	正常	正常	P	赤血球前駆細胞	0	0	0	0
							骨髄系前駆細胞	2	2	0	0
							巨核細胞	2-3	2-3	1	0
							マクロファージ	1-2	2	0	0
							顆粒球	3	3	0	occ 2
3	M	76	骨髄	正常	正常	P	赤血球前駆細胞	0	0	0	0
							骨髄系前駆細胞	2	2	0-1	0
							巨核細胞	2-3	2-3	1	0
							マクロファージ	2	2	1	0
							脂肪細胞	2	2	2	2
4	M	16	肝臓	正常	正常	P	肝細胞	0	0	0	0
							胆管上皮細胞	0-1	0	0	0
							クッパー細胞	1-2	0-1	0	0
							その他	0	0	0	0
5	M	55	小腸	正常	正常	P	上皮細胞	0	0	0	0
							平滑筋	0	0	0	0
							炎症細胞	0	0	0	0
							杯状細胞ムチン,刷子縁	3	3	3	3

【０１０７】

hOPG-hIgG1-Fc-FITCでの結果：

hOPG-hIgG1-Fc-FITCは、５－１０μｇ／ｍｌの濃度で、マントルゾーンを含む扁桃中のリンパ球内、および胸腺中の胸腺細胞内で、弱い～時には中程度の染色を示した。中程度の染色はまた、胸腺小体にも見られた。前立腺は大部分は陰性染色であったか、または平滑筋が赤色染色を示すことがあった。精巣内では、精原細胞および時には精母細胞が、まれに赤色がかった染色を示し、ライディッヒ細胞は陰性染色であった。子宮は子宮平滑筋の赤色がかった染色を示し、そして、卵巣は、間質細胞の赤色がかった染色を示した。胎盤は、合胞体の中程度の染色を示し、そして内皮および時には間質細胞の弱い～中程度の染色を示した。小腸は、上皮の赤色がかった染色と、刷子縁および杯状細胞ムチンの中程度～強度の染色を示した。血管、線維芽細胞、神経節および粘膜下層や筋層の平滑筋は陰

性染色であった。肝臓切片は、肝細胞の弱～中等度の染色を示し、類洞（シヌソイド）内皮細胞の弱～時折中等度の染色を示した。

【０１０８】

PROLIA-FITCでの結果：

PROLIA-FITCは、２．５～５ベクターｇ／ｍｌの濃度で、扁桃腺中のリンパ球サブセット内、特にリンパ濾胞の外套ゾーン内で中程度～時には強い染色と、適度な染色に気絶胸腺中の髄質のリンパ球の時には強い染色を示した。前立腺は陰性染色であった。精巣は、精原細胞のまれな赤色がかった染色を示したが、精母細胞とライディッヒ細胞の大部分が陰性染色であった。子宮は、子宮筋層の平滑筋のかすかな染色を示し、そして卵巣セクションでは、血管平滑筋のかすかな染色を示した。胎盤は、合胞体の中程度の染色を示し、内皮および時には間質細胞の中程度の染色を示した。小腸は、上皮の赤色がかった染色と、刷子縁の中程度～強い染色を示した。血管、線維芽細胞、神経節および粘膜下層や筋層の平滑筋は陰性染色であった。肝臓切片は、肝細胞のかすかな染色を示した。

【０１０９】

ENBREL-FITCでの結果：

ENBREL-FITCは、１．２５μｇ／ｍｌの濃度で、胸腺および扁桃腺中のリンパ球の中程度～時には強い膜状の染色を示した。前立腺は、上皮細胞の中程度の染色と平滑筋のかすかな染色を示した。胎盤は、合胞体サブセットの中程度～時には強度の染色と、間質細胞および時には細胞栄養芽層の弱い～中程度の染色、および内皮の弱い染色を示した。卵巣は、間質細胞の弱い染色を示した。子宮サンプルは子宮平滑筋の弱い染色を示し、そして血管内皮および血管平滑筋は、大部分が陰性染色を示した。精巣内では、精原細胞および時には精母細胞は、中程度の染色を示し、ライディッヒ細胞は陰性染色であった。小腸は、上皮の中程度の染色、刷子縁の強い染色を示し、そして粘膜下血管および線維芽細胞の陰性染色を示した。

【０１１０】

まとめると、５μｇ／ｍｌのhOPG-hIgG1-Fc-FITCおよび２．５μｇ／ｍｌのPROLIA-FITCは、扁桃腺および胸腺のリンパ球内の陽性染色と、脾赤色髄の類洞内皮細胞の陽性染色を示した。両試薬はまた、胎盤の栄養芽層および内皮の陽性染色、子宮筋層の平滑筋の弱い染色を示し、そして前立腺内の大部分は陰性染色であった。肝細胞もまた両試薬で陽性であった。陽性染色を示した細胞タイプは、PROLIA-FITCおよびhOPG-hIgG1-Fc-FITC間でよく似ていた。ENBREL-FITCは、他の２つの試薬とは対照的に、リンパ球、胎盤の栄養芽層および内皮ならびに子宮筋層の平滑筋の陽性染色を示したが、前立腺上皮および精巣の精細管でも陽性染色を示した。ENBREL-FITCの染色のパターンは、互いにより類似しているPROLIA-FITCとhOPG-hIgG1-Fc-FITCと比較して、差異を示した。

【０１１１】

“Prolia”、“Xgeva”および“Enbrel”は、アムジェン社（デラウェア州の株式会社）の登録商標である。

【０１１２】

本明細書に記載される全ての刊行物および特許は、各個々の刊行物または特許が具体的かつ個別に引用により組み込まれることが示されるかのように、その内容全体が引用により本明細書中に包含される。

【０１１３】

本発明の目的の特定の態様を論じてきたが、上記の明細書の記載は例示であって、限定するものではない。本明細書および特許請求の範囲を検討することにより、多くの変形が当業者に明らかになるであろう。本発明の範囲全体は、特許請求の範囲の均等の範囲全体、および明細書の記載と共に、多くの変形と共に、特許請求の範囲を参照することによって決定されるべきである。

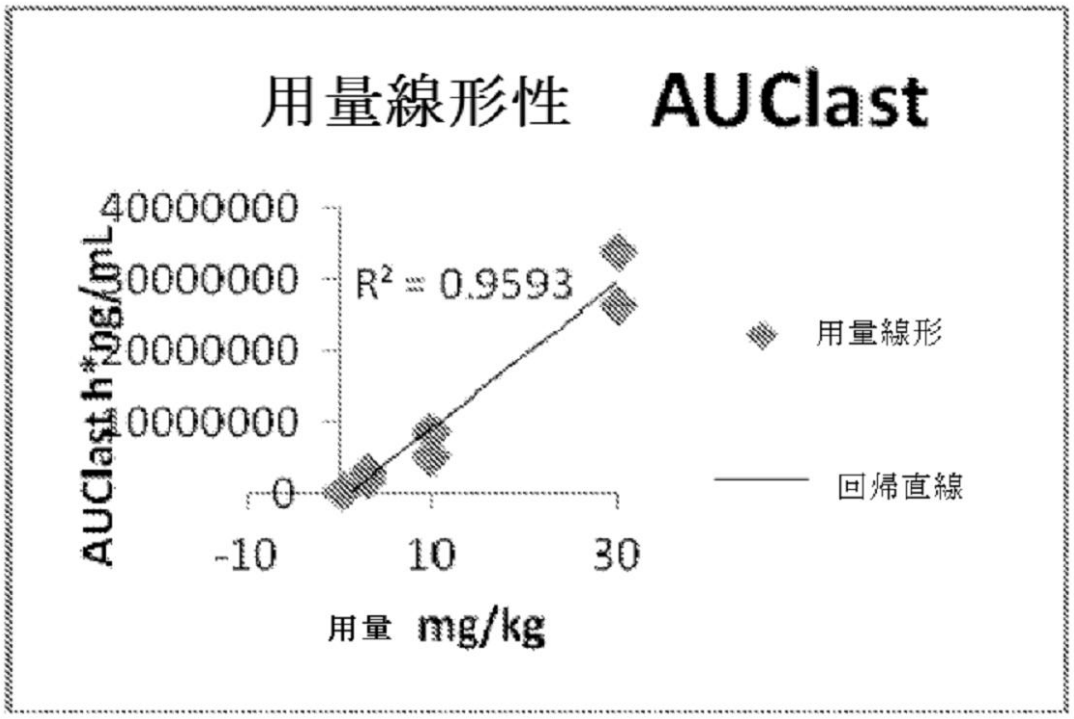
【誤訳訂正３】

【訂正対象書類名】図面

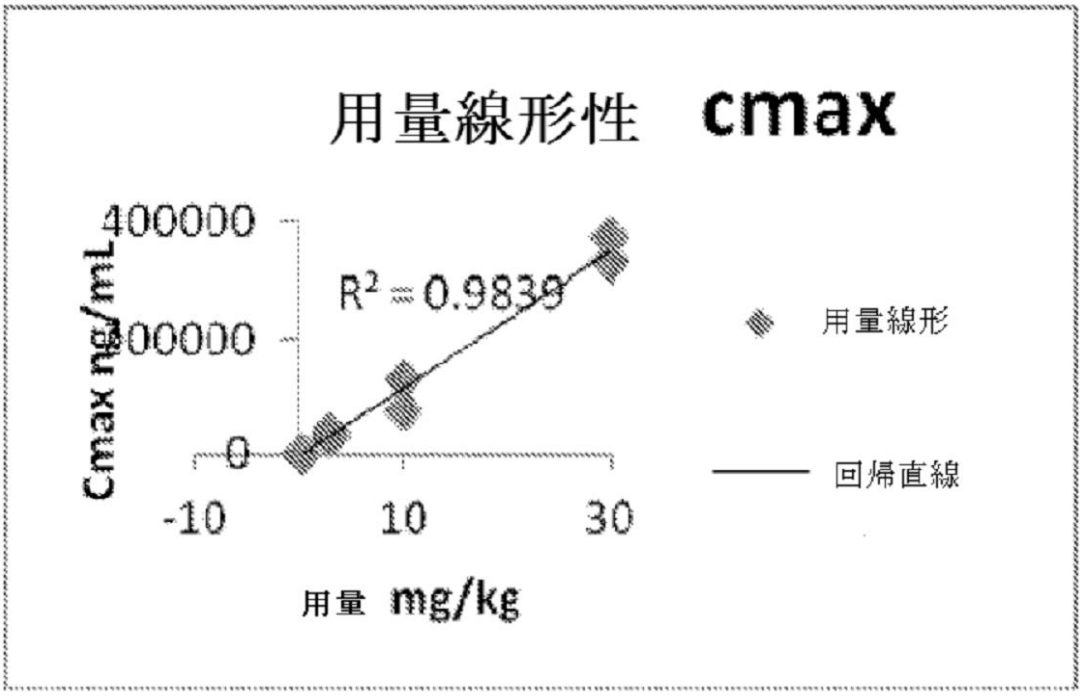
【訂正対象項目名】図４

【訂正方法】変更
【訂正の内容】

【図４】



A)

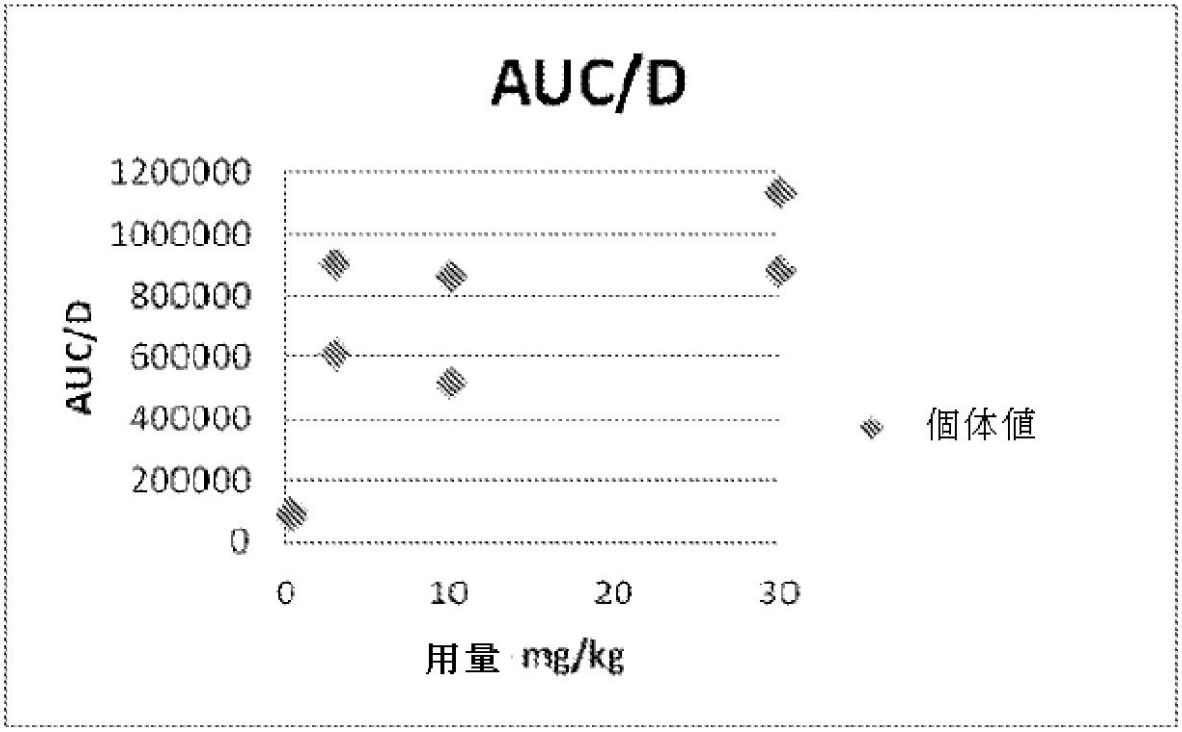


B)

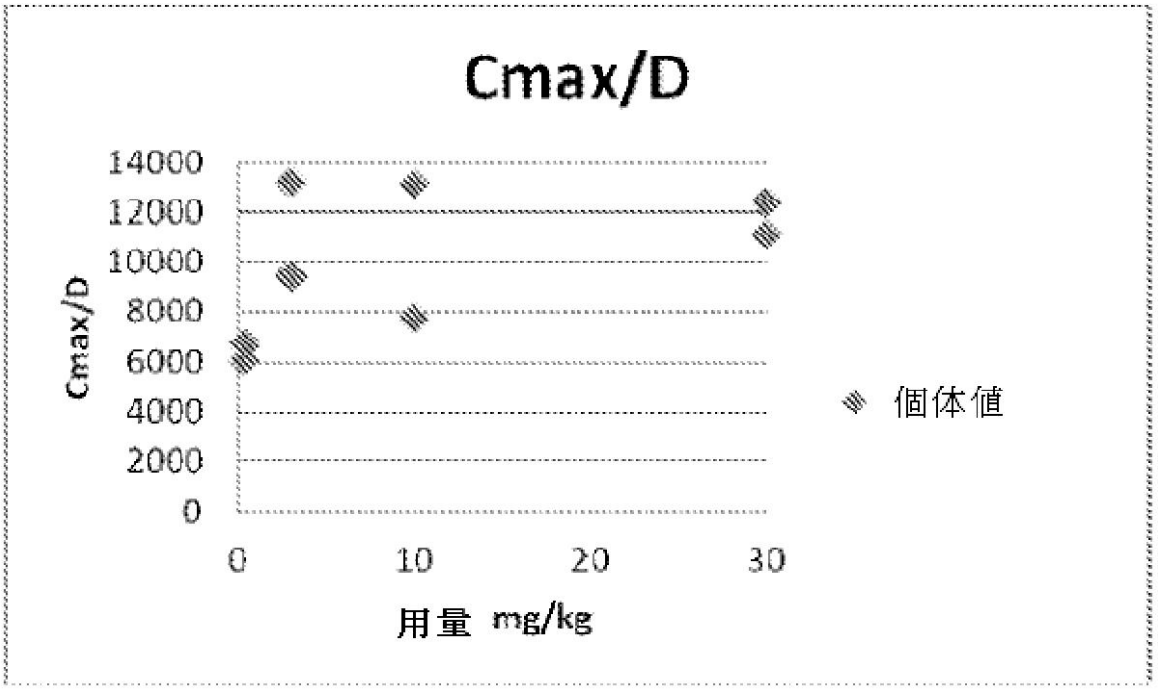
FIGURE 4

【誤訳訂正４】
【訂正対象書類名】図面
【訂正対象項目名】図５
【訂正方法】変更
【訂正の内容】

【図５】


AUC/D
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
AUC/D
0
10
20
30
用量 mg/kg
個体値

A)


Cmax/D
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Cmax/D
0
10
20
30
用量 mg/kg
個体値

B)