(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0127824
(43) 공개일자 2016년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70578 (2013.01)
A61K 38/177 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7027850
(22) 출원일자(국제) 2014년03월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년10월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/021417
(87) 국제공개번호 WO 2015/134032
국제공개일자 2015년09월11일

(71) 출원인
알-팜 오버씨즈, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 92130, 샌 디에고, 12526 하이 블러프 드라이브 수이트 300
(72) 발명자
라브로프스키, 얀
미국, 캘리포니아 92104, 델 마, 1969 자포 스트리트
수, 팅
미국, 매사추세츠 01776, 서드베리, 11 도슨 드라이브
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

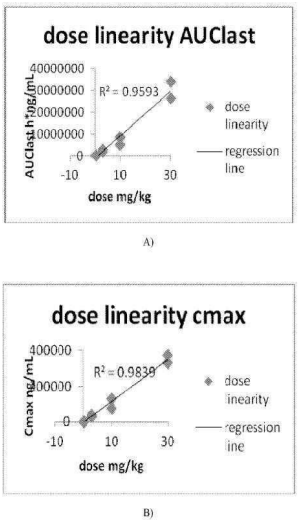
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **오스테오프로테게린 유래의 RANKL 억제제**

(57) 요 약

골 흡수와 연관된 질환, 특히 전이성 암종의 치료 또는 예방에 사용될 수 있는 약제학적 조성물이 기술된다. 특정 측면에서, 조성물은 인간 IgG1 단백질의 Fc 부분이 수반되는 인간 오스테오프로테게린 (osteoprotegerin)의 선두 215개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 토대로 한다. 약제학적 조성물을 피하 및 정맥내 경로를 통해 영장류에 투여하기에 적합한 약제학적 제형이 제공된다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 47/48369 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C07K 2319/32 (2013.01)
(72) 발명자
코스타레바, 이리나
미국, 코네티컷 06905, 스탬포드, 아파트 8, 15 퍼스트 스트리트
아르추어즈, 쇼르나
러시아, 141002, 모스크바, 미티쉬치, 19/2 인스티투츠카야 스트리트
삼소노프, 미하일
러시아, 121353, 모스크바, 74-6-77 레닌그라드스키 프로스펙트
이그나티에브, 바실리
러시아, 121353, 모스크바, 아파트 212, 13 스콜콥스코예 쇼세
레픽, 알렉세이
러시아, 121609, 모스크바, 아파트 106, 3 오세니이 블러바드

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 RANKL을 억제하는 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이:

인간 오스테오프로테게린의 아미노산 1 내지 215를 포함하는 제1 아미노산 서열, 및

인간 면역글로불린 감마-1 Fc의 아미노산 103 내지 329를 포함하는 제2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하고,

상기 폴리펩티드가 약 5×10^{-13} M 이하의 Kd 값으로 인간 RANKL에 결합하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 3

치료학적 조성물로서, 상기 조성물이 인간 RANKL에 결합하는 폴리펩티드를 포함하고, 상기 폴리펩티드가 인간 오스테오프로테게린의 생물학적 활성 부분 및 인간 면역글로불린 감마-1의 Fc 부분을 포함하고, 상기 폴리펩티드가 약 5×10^{-13} M 이하의 Kd 값으로 인간 RANKL에 결합하는 것인, 치료학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 약 25 mM 인산나트륨, 약 50 mM 내지 약 100 mM NaCl, 약 20 내지 약 25 mM L-아르기닌 염산염을 추가로 포함하고, 약 6.3 내지 약 6.8의 pH 값을 갖는, 치료학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 약 10 mg/mL의 수크로스를 추가로 포함하는, 치료학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 약 10 mg/mL 내지 약 25 mg/mL의 만니톨을 추가로 포함하는, 치료학적 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 3 mg/kg의 용량으로 피하 투여 후 사이노몰구스 원숭이 (Cynomolgus monkey)의 체순환에서 상기 폴리펩티드의 반감기가 적어도 48시간인 것인, 치료학적 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 10 mg/kg의 용량으로 피하 투여 후 사이노몰구스 원숭이의 체순환에서 상기 폴리펩티드의 반감기가 적어도 38시간인 것인, 치료학적 조성물.

청구항 9

골 재형성 (bone remodeling)과 연관된 질환의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한 물질의 용도로서, 물질이 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 것인, 용도.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 질환이 암종인 것인, 용도.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 질환이 유방암인 것인, 용도.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 질환이 전립선암인 것인, 용도.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 질환이 다발성 골수종인 것인, 용도.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 질환이 골육종인 것인, 용도.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 질환이 고형 종양에 기인한 골 전이인 것인, 용도.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 질환이 골다공증인 것인, 용도.

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 질환이 류마티스 관절염인 것인, 용도.

청구항 18

제9항에 있어서, 상기 질환이 건선 관절염인 것인, 용도.

청구항 19

골 재형성과 연관된 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 상기 방법이 골 재형성과 연관된 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에 서열번호: 1의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 질환이 전이성 암종인 것인, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 질환이 암종인 것인, 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 질환이 유방암인 것인, 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 질환이 전립선암인 것인, 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 질환이 다발성 골수종인 것인 방법.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 질환이 골육종인 것인, 방법.

청구항 26

제19항에 있어서, 상기 질환이 고형 종양에 기인한 골 전이인 것인, 방법.

청구항 27

제19항에 있어서, 상기 질환이 골다공증인 것인, 방법.

청구항 28

제19항에 있어서, 상기 질환이 류마티스 관절염인 것인, 방법.

청구항 29

제19항에 있어서, 상기 질환이 건선 관절염인 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 일반적으로, 본 발명은 생물학적 제약뿐 아니라 골 재흡수와 연관된 증상 (conditions associated with bone resorption), 예를 들어, 종양학에 사용되는 그의 용도와 관련된 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 RANKL (Receptor activator of NF-kappaB ligand)에 결합하는 오스테오프로테게린 (osteoprotegerin)-유래의 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 본 부분에 기술된 접근법은 추구될 수 있는 것이고, 반드시 이전에 구상되거나 추구되었던 접근법이라고 할 수 없다. 따라서, 다르게 표시되지 않는 한, 본 부분에 포함되어 있다는 것만으로, 본 부분에 기술된 어떠한 접근법도 선행기술로서 자격이 있다고 추정되어서는 안 된다.

[0003] 골 (bone) 전이는 고형암 환자의 15-75% 및 다발성 골수종 환자의 거의 100% 발생 정도를 갖는, 고형암 (solid tumors) 및 혈액암 (hematologic cancers) 양쪽의 일반적인 합병증이다. 암은 대부분 골로 전이할 개연성이 높으며, 유방암, 폐암, 전립선암, 갑상선암, 및 신장암을 포함한다. 골 전이 비율은 암의 다른 종류에 따라 다음과 같다:

[0004] - 다발성 골수종 - 70 - 95% - 유방암 - 65-75% - 전립선암 - 65-75% - 폐암 - 30-40% - 신장암 - 40% - 방광암 - 20 - 25% - 흑색종 - 14 - 45%.

[0005] 골 전이의 골격 합병증 (Skeletal complications)은 통증, 병적골절, 척수 압박, 및 다른 신경-암박 증후군에 기인한 유의한 병적상태를 차지한다.

[0006] 골 전이는 골용해성 (osteolytic), 골형성성 (osteoblastic), 또는 둘의 혼합일 수 있다. 정상 골 재형성은 균형잡힌 순서 (balanced sequence)안에서 조골세포 (osteoblast) 및 파골세포 (osteoclast)에 의해 조절된다. 종양 괴사 인자 (tumor necrosis factor) 패밀리의 멤버인 RANKL (RANK (Receptor activator of nuclear factor κB) ligand)는 조골세포 표면상에서 발현된다. RANKL은 파골세포 상의 RANK 수용체에 결합하고, 이는 TRAFs (TNF receptor-associated factors)를 통한 신호전달을 이끌고, 골을 분해하거나 재흡수하는 성숙한 파골세포로의 분화를 포함하는 핵 내의 핵인자 κB (nuclear factor κB)의 궁극적인 활성화를 이끈다. 다른 파골세포-활성화 인자는 부갑상선 호르몬-연관 단백질, 인터류킨, 및 케포카인을 포함한다. RANKL의 미끼 수용체 (decoy receptor), 오스테오프로테게린 (OPG), 는 골수에 존재하고, 조골세포에 의해 분비되고, 조골세포 및 파골세포 간의 균형자 (balance)로 작용한다.

[0007] 암에서 골 전이의 환경 (setting)에서, RANKL, RANK 및 OPG간의 교차 대화가 파괴된다. 파골세포 활성화는 전이가 인터류킨, 부갑상선 호르몬-연관 단백질, 및 다른 인자가 분비될 때 증대되고, 이는 RANKL 발현을 상향 조절한다. 이러한 인자들은 또한 OPG를 억제한다. 게다가, 골병변으로부터 분비되는 성장인자는 종양세포의 성장을 자극하고, 악순환을 경화시킨다 (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).

[0008] 인간 OPG (GenBank: U94332.1)는 401개 아미노산 단백질로 21개 아미노산의 시그널 펩타이드를 포함하고, 이는 글루탐산 22 전에서 잘려서 380개 아미노산의 성숙한 용해성 단백질 (mature soluble protein)이 된다. OPG는 TNFR (tumor necrosis factor receptor) 패밀리의 멤버로, 이의 N-말단 영역에 4개의 시스테인-풍부 TNFR 유사 도메인을 포함한다. OPG는 골의 발달에서 역할을 갖는 것으로 나타나졌었고, OPG 유전자가 부족한 쥐는 골공증 (osteoporotic) 형질 (phenotype)을 갖고, 골격 기형 (skeletal abnormalities)이 증대한다.

[0009] 골수 기질 세포 (stromal cells) 및 조골세포에 의해 생성되는 OPG는 명확한 직접적인 신호전달 기능이 없는, 분비된 미끼 수용체로 작용한다. OPG는 또한 RANKL로 알려진, 이의 자연적 리간드-오스테오프로테게린 리간드 (OPGL)에 결합하여 작용한다. OPG 및 RANKL 간의 결합은 RANKL이 이의 동족 수용체 (cognate receptor)인 RANK를 활성화하는 것을 막고, 이는 파골세포 수용체로 파골세포 분화, 활성화 및 생존에 중요하다.

[0010] 재조합 OPG는 단량체 (monomeric) 및 이량체 (dimeric) 형태로 명확한 분자량이 각각 약 55 kDa 및 약 110 kDa이다. TNFR-유사 도메인의 디설파이드 결합을 아마 파괴함에 따라, N-말단 도메인의 시스테인 185 잔기 절단은 OPG 비활성화 결과를 가져오고, 반면에 단백질의 194 잔기의 C-말단 영역의 절단은 생물학적 활성을 변화시키지 않는다.

[0011] 형질전환 쥐 (transgenic mice) 내의 OPG 과발현은 쥐 안의 파골세포의 거의 완전환 부족에 의해 특징되는 엄청난 골석화증 (osteopetrosis)을 이끈다. 정반대로, OPG 유전자의 절제는 쥐에서 심각한 골다공증을 이끌며, 이는 골 재흡수 조절에서 OPG가 중요한 생리적인 역할을 하는 것을 나타낸다. 조골세포 및 기질세포로부터의 OPG 및 RANKL의 분비는 다수의 호르몬 및 사이토카인에 의해 조절된다. OPG 및 RANKL 생산의 상대적 수준은 골 재흡수의 정도: 골 재흡수를 증가하는 RANKL의 발현을 조절한다고 생각되고, 반면에 과도한 OPG는 반대 효과를 갖는다. 재조합 OPG는 시험관 및 생체 내에서 파골세포를 자극하는 어마어마한 대부분의 인자의 효과를 차단한다. OPG는 또한, 난소절제술, 유도된 골다공증, 악성의 체액성 고칼슘혈증 (humoral hypercalcemia), 및 실험적 골전이를 포함하는 다수의 동물 질환모델에서 골 재흡수를 억제한다. 따라서, OPG는 과도한 파골세포 활성과 연관된 질환의 효과적인 치료 옵션을 대표할 것이다 (Kostenuik PJ, Shalhoub V., Curr Pharm Des. 2001 May;7(8):613-35).

[0012] RANK/RANKL 경로 (pathway)는 골 전이의 효과적인 치료로 입증된 타겟으로 잘 알려져 있다. 데노수맙 (Denosumab)은 인간 RANKL에 결합하는 고 친화성 모노클로날 항체이고, RANK와의 이의 상호작용을 억제하고, 따라서, OPG의 활성화 모드와 유사하다. 데노수맙은 IgG2 서브클래스의 전장 인간 모노클로날 항-RANKL 항체이고, 2개의 중쇄, 및 2개의 카파 서브클래스의 경쇄로 이루어져 있고, CHO (Chinese hamster ovary) 세포에서 제조된다. 데노수맙은 프롤리아 (Prolia) 상표명으로 미국 FDA (Food and Drug Administration)에 의해 폐경 후 여성의 골다공증 치료제로 승인되었다. 데노수맙은 엑스제바 (Xgeva) 상표명으로 미국 FDA (Food and Drug Administration)에 고형암의 골 전이를 갖는 환자의 골격-관련 증상의 예방용으로 승인되었다. 추가적인 데노수맙의 다른 골 재형성 관련 증상과 관련된 임상적 시험이, 즉 다른 형태의 암으로부터의 골전이에 대해 현재 진행되고 있다 (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).

[0013] 따라서, RANKL에 결합할 수 있고, 허용할 수 있는 약리학적 프로파일을 갖으면서도, 넓은 치료학적 가능성을 갖는, 자연적으로 발생하는 OPG 분자에 근거한 치료학적 조성물을 갖는 것이 바람직할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 이 요약은 상세한 설명에서 더 자세히 기술되는, 단순화된 형태로 개념의 선택을 도입하기 위해 제공된다. 이 요약은 청구된 주제의 핵심적 특징 또는 필수적 특징을 확인하기 위한 것으로 의도되지 않으며, 또한 청구된 주제의 범주를 결정하는데 보조물로서 사용되는 것으로도 의도되지 않는다.

[0015] 특정 측면에서, 본 발명은 약 5×10^{-13} M 이하의 Kd 값으로 인간 RANKL에 결합하는 폴리펩티드를 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 폴리펩티드는 인간 오스테오프로테게린 (GenBank: U94332.1)의 아미노산 1 내지 215를

포함하는 제1 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 감마-1 Fc (GenBank: J00228.1)의 아미노산 103 내지 329를 포함하는 제2 아미노산 서열을 추가로 포함한다. 폴리펩티드는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0016] 특정 측면에서, 본 발명은 치료학적 조성물을 제공한다. 조성물은 인간 RANKL에 결합하는 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드는 인간 오스테오프로테게린의 생물학적 활성 부분 및 인간 면역글로불린 감마-1의 Fc 부분을 포함한다. 폴리펩티드는 약 5×10^{-13} M 이하의 Kd 값으로 인간 RANKL에 결합한다.

[0017] 폴리펩티드는 3 mg/kg의 용량으로 치료학적 조성물의 피하 투여 후 사이노몰구스 원숭이 (Cynomolgus monkey)의 체순환에서 적어도 48시간의 반감기를 나타낼 수 있다. 폴리펩티드는 10 mg/kg의 용량으로 치료학적 조성물의 피하 투여 후 사이노몰구스 원숭이의 체순환에서 적어도 38시간의 반감기를 나타낼 수 있다.

[0018] 치료학적 조성물은 또한 약 6.3 내지 약 6.8의 pH 값을 가지면서, 약 25 mM 인산나트륨, 약 50 mM 내지 약 100 mM NaCl, 약 20 내지 약 25 mM L-아르기닌 염산염을 함유할 수 있다. 치료학적 조성물은 또한 약 10 mg/mL의 수크로스를 함유할 할 수 있다. 치료학적 조성물은 또한 약 10 mg/mL 내지 약 25 mg/mL의 만니톨을 함유할 수 있다.

[0019] 특정 측면에서, 본 발명은 골 흡수 또는 재형성과 연관된 질환의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한 물질의 용도를 제공한다. 물질은 인간 RANKL에 결합하는 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드는 인간 오스테오프로테게린의 아미노산 1 내지 215를 포함하는 제1 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 감마-1 Fc의 아미노산 103 내지 329를 포함하는 제2 아미노산 서열을 추가로 포함한다. 폴리펩티드 내 제1 아미노산 서열이 제2 아미노산 서열에 선행할 수 있다. 폴리펩티드는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 골 흡수 또는 재형성과 연관된 질환은 암종, 유방암, 전립선암, 다발성 골수종, 고형 종양에 기인한 골 전이, 골다공증, 류마티스 관절염, 또는 건선 관절염일 수 있다.

[0020] 특정 측면에서, 본 발명은 골 흡수 또는 재형성과 연관된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 방법은 골 흡수 또는 재형성과 연관된 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에 인간 RANKL에 결합하는 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 폴리펩티드는 인간 오스테오프로테게린의 아미노산 1 내지 215를 포함하는 제1 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 감마-1 Fc의 아미노산 103 내지 329를 포함하는 제2 아미노산 서열을 추가로 포함한다. 폴리펩티드 내 제1 아미노산 서열이 제2 아미노산 서열에 선행할 수 있다. 폴리펩티드는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 골 흡수 또는 재형성과 연관된 질환은 암종, 유방암, 전립선암, 다발성 골수종, 고형 종양에 기인한 골 전이, 골다공증, 류마티스 관절염, 또는 건선 관절염일 수 있다.

[0021] 본원에 기술된 본 발명의 이들 및 다른 측면과 이점은 하기 도면 및 상세한 설명의 고려 시 자명해질 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 본원에 개시되는 내용은, 부분적으로, 인간 IgG의 Fc 부분에 결합하는, 생물학적으로 활성된 OPG의 N-말단 부위를 포함하는 단백질 분자의 엔지니어링에 의존한다. 상기와 같은 OPG 유래 (OPG-derived) 단백질 분자의 재조합 생산을 가능하게 하기 위해, 이종 단백질 발현 시스템 (heterologous protein expression system)에서 단백질 분자를 과생산 (overproducing)하기 위한 DNA 발현 벡터를 제조하였다. 또한, 높은 발현 수준으로 안정적으로 단백질 분자를 발현하는 포유류 세포를 준비하였다. 본 발명의 구성 (composition)의 설계 (design), 제조 (preparation), 및 예비 캐릭터리제이션 (preliminary characterization)는 부분적으로 국제 특허 공개 제 WO/2013/147899호 (2013년 10월 3일)에 개시되어 있으며, 이는 전체로서 본 발명에 참조로 포함된다.

[0023] 재조합 원천 유래 단백질 분자 (the protein molecule from the recombinant source)는 용액에서 호모 다이머 (homo-dimmer) 및 호모 테트라머 (homo-tetramer)를 형성한다. 단백질 정제 과정은 생리학적으로 관련있는 상당히 순수한 (physiologically relevant substantially pure), 단백질 분자의 호모 다이머 제조를 가능케 하도록 고안되었다. 예상외로, 정제된 단백질 분자는 인 비트로 결합 어세이 (in vitro binding assay)에서 RANKL에 대해 예외적으로 높은 수준의 결합력을 보였다. 약학적 제제는 영장류에 단백질 분자의 피하 및 정맥 투여가 가능하도록 고안되었다. 이에 제제화된 단백질 분자는 영장류에 피하 및 정맥 투여시 허용 가능한 약물 동태학 프로파일 (pharmacokinetics profile)을 나타낸다. 더 나아가, 제제화된 단백질 분자는 인간에 피하 투여시 상당한 전신 약물 노출 (substantial systemic exposure)을 나타내었다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명의 맥락 (context) 및 각 용어가 사용되는 구체적인 맥락 내에서 당업계에

서 보통 사용되는 의미를 가진다. 당업자에게 본 발명의 조성물 및 방법을 설명하고, 어떻게 제조하고 사용하는지에 관한 추가적인 설명을 제공하기 위한 특정 용어는 하기 또는 본 명세서의 다른 곳에서 설명한다. 용어 사용의 범위 또는 의미는 상기 용어가 사용되는 특정 문맥에서 명확할 것이다. "약" 또는 "대략"은 측정의 본질(nature) 또는 정밀성 (precision)에 의한 측정되는 양(quantity)의 허용 가능한 정도의 오차를 의미한다. 보통, 예시적인 오차의 정도는 주어진 값 또는 값의 범위의 20% 내이며, 바람직하게는 10% 내이며, 보다 바람직하게는 5%이다. 대체하여, 또한, 특히, 생물학적 시스템에서는 "약" 및 "대략"이라는 용어는 크기 차수 (order of magnitude) 내 중간 값 (mean value)을 의미할 수 있다. 바람직하게는 주어진 값의 5배 (5-fold) 내, 보다 바람직하게는 2배 (2-fold) 내를 의미할 수 있다. 여기에서 주어지는 수치량 (numerical quantity)은 다르게 표현되지 않는 한, 근사값(approximate)이며, 이는 "약" 또는 "대략"이라는 용어 없이도 이를 유추 할 수 있다는 것을 의미한다.

[0025] 본 발명의 방법은 서열을 서로 비교하는 단계를 포함할 수 있고, 이는 야생형 서열을 한 개 또는 그 이상의 변이체 (서열 변이체)에 비교하는 것을 포함할 수 있다. 상기와 같은 비교는 통상적으로 폴리머 서열의 정렬(alignment)을 포함하고, 예를 들어 당업계에 알려진 서열 정열 프로그램 및/또는 알고리즘 (예를 들어, 몇 가지만 나열하자면 BLAST, FAST, 및 MEGALIGN)을 사용하는 것을 포함한다. 숙련된 당업자는 이러한 정렬에서, 변이가 잔기의 도입 또는 결실을 포함하는 경우, 서열 정렬은 도입되거나 결실된 잔기를 포함하지 않는 폴리머 서열에 "갭 (gap)"(통상적으로 대쉬 (dash) 또는 "A"로 표현된다)을 도입하는 것을 손쉽게 인식할 수 있다.

[0026] 본 발명의 방법은 통계학적인 계산, 예를 들어 IC50 또는 EC50 값의 결정 등을 포함할 수 있다. 숙련된 당업자는 이러한 계산은 다양한 상업적으로 이용가능한 소프트웨어, 예를 들어 PRISM (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) 또는 이와 유사한 것을 이용하여 수행될 수 있음을 손쉽게 인식할 수 있다.

[0027] "상동", 이의 모든 문법적 형태 (grammatical form) 및 철자 변형 (spelling variation), 은 동일 종의 생물 내 상과 (superfamilies in the same species of organism)으로부터 유래된 단백질 및 다른 종의 생물로부터 유래된 상동 단백질을 포함하는, "공통된 진화적 기원 (common evolutionary origin)"을 가지는 두 단백질 간의 관계를 의미한다. 이러한 단백질 (또한 이들을 코딩하는 핵산)은 퍼센트 동일성 (percent identity) 측면 또는 또는 특정 잔기 또는 모티프 (motif) 및 보존된 위치 (conserved position)가 존재하는지 여부에 따라 이들의 서열 유사성에 의해 반영되는 서열 상동성을 가진다. 그러나, 통상적인 사용 및 본 발명에서, "상동"이라는 용어는 "높은"과 같은 부사로 수식될 경우, 서열 유사성을 의미할 수 있고, 통상적인 진화적 기원에 관계될 수도 있고, 아닐 수도 있다.

[0028] 본 발명에서, "서열 유사성"이란 용어는, 이의 모든 문법적 형태에서, 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 간의 동일성 또는 상응성의 정도를 의미한다.

[0029] 본 발명에서, "단백질" 및 "폴리펩티드"는 상호 교환적으로 사용된다. 보통, 포유류에서 사용되는 본 발명의 OPG-유래 단백질은 CHO 또는 HEK293 세포주 (cell line)와 같은 포유류 세포에서 발현되어, 적절한 번역 후 수식 (post-translational modification)이 가능하지만, 다른 포유류 발현 세포주 역시 유용할 것으로 예상할 수 있다. OPG-유래 단백질이 생물학적 기능에 큰 영향을 미치지 않고 번역 후 수식될 것으로 예상할 수 있다.

[0030] 특정 측면에서, 본 발명의 OPG-유래 단백질 분자의 기능적인 변이체 (functional variant)는 최소한 인간 OPG의 생물학적으로 활성된 부위 및 하나 또는 그 이상의 융합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함할 수 있다. 이러한 융합 단백질의 잘 알려진 예는, 폴리히스티딘 (polyhistidine), Glu-Glu, 글루타티온 S 트랜스퍼라제 (glutathione S transferase, GST), 티오레독신 (thioredoxin), 프로테인 A (protein A), 프로테인 G (protein G), 면역글로불린 중쇄 불변 영역 (an immunoglobulin heavy chain constant region, e.g., an Fc), 말토스 결합 단백질 (maltose binding protein, MBP), 또는 인간 혈청 알부민 (human serum albumin)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 융합 도메인은 바람직한 성질을 얻을 수 있도록 선택될 수 있다. 예를 들어, OPG 폴리펩티드 부위는 OPG 폴리펩티드를 생체내 (*in vivo*)에서 안정화시키는 도메인 ("안정화 (stabilizer)" 도메인)과 융합될 수 있고, 선택적으로 적합한 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 용어, "안정화 (stabilizing)"은 체순환 (systemic circulation) 내 폴리펩티드의 반감기를 증가시키는 어느 것이든 의미할 수 있고, 분해 (destruction)의 감소에 의한 것인지, 제거 (clearance)의 감소에 의한 것인지, 또는 다른 약물동태학적인 효과에 의한 것인지 고려하지 않는다. 면역글로불린 (immunoglobulin)의 Fc 영역과의 융합은 특정 단백질의 바람직한 약물 동태학적인 성질을 부여하는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에의 융합도 바람직한 성질을 부여할 수 있다. 선택 가능한 다른 유형의 융합 도메인은 다량체화 (multimerizing, 예를 들어, 이량체화 (dimerizing), 4량체화 (tetramerizing)) 도메인, 및 생체내 (in vivo)에서 목적하는 부위에서

의 활성(action)의 축적을 촉진시키는 것과 같은 추가적인 생물학적 기능을 부여하는 기능적 도메인(functional domain)을 포함한다.

[0031] 특정 측면에서, 본 발명은 인간 OPG (GenBank: U94332.1)의 선두 215개 아미노산, 및 이에 연결된 인간 Ig 감마-1 (GenBank: J00228.1)의 Fc 부분의 227개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 하나의 구체예로서, 본 발명의 단백질 분자는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 (서열번호: 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
```

[0033]

[0034] 특정 측면에서, 본 발명은 인간 OPG의 선두 215개 아미노산, 및 이에 연결된, 선택적으로 플렉서블 링커(flexible linker)에 의해 연결된, 인간 Ig 감마-1의 Fc 부분의 227개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)을 가지는 재조합 DNA 분자를 제공한다. 하나의 구체예로서, 본 발명의 상기 재조합 DNA 분자는 서열번호: 2의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0035] hOPG-hIgG1-Fc DNA (서열번호: 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]

[0037] 특정 측면에서, 본 발명은 인간 OPG의 선두 215개 아미노산, 및 이에 연결된, 선택적으로 플렉서블 링커(flexible linker)에 의해 연결된, 인간 Ig 감마-1의 Fc 부분의 227개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 과발현 (high expression)하기 위한 재조합 포유류 발현 플라스미드를 제공한다. 상기 플라스미드는 상기 폴리펩티드를 코딩하기 위한 유전자의 전사를 유도 (drive) 하기 위한 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus, CMV) 프로모터, 및 이에 연결된 bGH 폴리아데닐화 (polyadenylation) 및 전사 종료 서열 (transcriptiton termination sequence)을 포함한다. 상기 플라스미드는 또한, 박테리아에서 플라스미드 증식 및 선택을 돕기 위한, pUC 복제 원점 (origin of replication) 및 앰피실린 저항성을 부여하는 β-락타마제 유전자 (β-lactamase gene)을 포함한다. 상기 플라스미드는 안정적인 CHOK1 및 NSO 세포주를 형성하는데 폭넓게 사용되는 선택 마커인 글루타민

합성효소 (Glutamine synthetase)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 포함한다.

[0038] 하나의 구체예로서, 본 발명의 포유류 발현 플라스미드는 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0039] hOPG-hIgG1-Fc 발현 플라스미드 (서열번호: 3)

```
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
```

[0040]

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

[0041]

[0042]

```
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
CCTATATGCC AATACACTGT CCTTCAGAGA CTGACACGGA CGCGTTTTGC GCTGCTTCGC   5940
```

```
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 TGCCCACCCT GCCCAGCTCC   8220
```

[0043]

```
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
```

[0044]

[0045] 특정 측면에서, 본 발명은 인간 OPG의 선두 215개 아미노산, 및 이에 연결된, 선택적으로 플렉서블 링커(flexible linker)에 의해 연결된, 인간 Ig 감마-1의 Fc 부분의 227개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 생산하기 위한 포유류 발현 시스템을 제공한다. 상기 본 발명의 발현 시스템은 인간 OPG의 선두 215개 아미노산, 및 이에 연결된, 선택적으로 플렉서블 링커에 의해 연결된, 인간 Ig 감마-1의 Fc 부분의 227개 아미노산을 포함하

는 폴리펩티드를 과발현하기 위한 재조합 포유류 발현 플라스미드를 가지는 포유류 세포를 포함한다.

[0046] 하나의 구체예로서, 본 발명의 포유류 발현 시스템은 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 플라스미드를 가지는 중국 햄스터 난소 세포 (chinese hamster ovary cell, CHO-K1)를 포함할 수 있다.

[0047] 특정 측면에서, 본 발명은 골 재흡수 (resorption) 또는 골 재형성 (remodeling) 연관된 질환에 의해 영향을 받은 포유류의 치료 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0048] 하기의 도면 및 설명은 본 발명을 이해하는 것을 돕기 위해 제공된다.

도 1은 BIAcore X100에 의해 생성된, 다양한 rshRANKL 농도에서의 데노수맙 (Denosumab)의 결합 및 해리 곡선에 관한 도이다.

도 2는 BIAcore X100에 의해 생성된, 다른 RANKL 농도에서의 서열번호: 1의 폴리펩티드의 결합 및 해리 곡선에 관한 도이다.

도 3은 0일차 시점 (패널 A), 67일차 시점 (패널 B), 및 176일차 시점 (패널 C)에서 분석된, 서열번호: 1의 폴리펩티드의 대표적인 크기-배제 HPLC 크로마토그램 (size-exclusion (SEC) HPLC chromatogram)에 관한 도이다.

도 4는 0.3, 3, 10, 및 30 mg/kg의 용량으로 피하 경로 (subcutaneous route of administration)로 투여되는, 서열번호: 1의 영장류 단일 폴리펩티드 (primate single polypeptide)의 C_{max} 및 AUC_{last}에 관한 용량 선형성 (dose linearity)에 관한 도이다.

도 5는 서열번호: 1의 영장류 단일 폴리펩티드 (primate single polypeptide)의 용량 시험 (dose study) 결과에 관한 도로서, 0.3, 3, 10, 및 30 mg/kg의 용량으로 피하 경로(subcutaneous route of administration)로 투여된 복용량에 대한 C_{max} 및 AUC_{last} 의한 용량에 의해 보정된 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] **실시예**

[0050] 다음의 실시예는 상술한 양태 및 본 발명의 다른 측면을 설명한다. 이러한 비제한적인 실시예는 본발명에서 기재된 화합물, 조성물, 물품, 장치, 및/또는 방법을 제조 또는 평가하는 방법에 대한 예시적인 실험 양태를 당업자에게 제공하기 위해 기재되었다. 상기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다. 숫자 (예를 들어, 양 , 온도 등)의 정확성을 확실히 하기 위해 노력하였지만, 오차 및 편차는 고려되어야 한다.

[0051] **실시예 1**: 본 발명의 폴리펩티드 제조

[0052] 서열번호: 1의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드는 당업계에 공지된 세포 배양 및 단백질 생화학적 기술을 이용하여 분자생물학적으로 CHO-K1을 발현하였고, PCT 공보 (WO/2013/147899)에 설명하였다. 구체적으로, 폴리펩티드를 발현하는 CHO-1 세포는 잘 기술된 프로토콜을 사용하여 수집하고 용해시켰다. 세포 용해물의 여과 (clarification) 후, 발현된 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드를 포함하는 상등액은 단백질 A 친화성 컬럼에 먼저 적용하였다. 단백질 A 컬럼 용출액에 pH를 맞추고, Q ㅅ세파로스 레진을 사용하여 양이온 교환 크로마토그래피 (AIEX)로 추가 정제하였다. AIEX 관류 (flowthrough)는 크기 배제 HPLC (SEC-HPLC), SDS-PAGE, 및 다른 적절한 분석 기술에 의해 분석하였다.

[0053] 후속 연구의 경우, HOPG-hIgG1-FC 폴리펩티드를 포함하는 치료용 조성물은 1 % 수크로스, 100 mM 염화나트륨, 20 mM L-아르기닌 염산염 및 25 mM 인산나트륨 (pH 6.3)를 포함하는 4 mL에 40 mg hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드를 포함하여 제조하였다. 싱글 바이얼은 4 mL 안에 약 40 mg hIgG1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 바이얼의 단백질 농도는 10±1 mg/mℓ이다.

[0054] **실시예 2**: 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석을 통해 본 발명의 RANKL에 대한 affinity 결합의 폴리펩티드 평가

[0055] 핵 인자 카파-B 리간드 (Nuclear Factor Kappa-B Ligand) (rshRANKL)의 재조합 수용성 인간 수용체 활성제에 대한 서열번호: 1의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 결합 친화도는 특별히 설계된 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석을 이용하여 측정하였다. 분석은 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드를 다른 농도의 rshRANKL 재조합 단백질 A 용액을 센서

표면에 분배함으로써 SPR 센서 표면에서 포착하여 결합 및 해리 동역학을 모니터링하였다.

[0056] 친화도는 데이터에 랑뮤어 (Langmuir) 결합 모델이 1:1로 피팅되게 하여 계산하였다.

[0057] 실험 재료, 시약 및 실험 장비:

[0058] Biacore CM5 Sensor Chip (GE Healthcare); Amine Coupling Kit (GE Healthcare); 50 mM 수산화나트륨 (GE Healthcare); 10 mM Na아세테이트 pH 4.5 (GE Healthcare); Surfactance P20 (GE Healthcare); 글리신 (Sigma-Aldrich); 10x PBS 버퍼 (GE Healthcare)

[0059] 버퍼:

[0060] 작용 버퍼: PBS+0.05% Surfactance P20 (pH7.26)

[0061] 재생 버퍼 (Regeneration Buffer): 5.4 ml의 10 mM 글리신 버퍼 + 4.6 ml의 10 mM 글리신 버퍼 (pH 1.7)

[0062] 실험 재료:

[0063] 데노수맙 (Prolia, commercial product , Amgen) 농도 60 mg/mL

[0064] 상기 실시예 1에 따라 제조한 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드

[0065] rshRANKL 농도 0.76 mg/mL (13 μM)

[0066] 실험 장비:

[0067] Biacore X100 Instrument (GE Healthcare)

[0068] Biacore X100 Evaluation Software V2.0.1 (GE Healthcare)

[0069] 과정:

[0070] 재조합 단백질 A는 10 mM Na아세테이트 (pH 4.5)로 희석하여 최종농도 0.025 mg/ml로 하였다. 단백질 A를 커플링 키트 및 다음의 파라미터: a) 1:1 EDC:NHS를 7분간 주입; b) 10 mM Na아세테이트 (pH 4.5)로 희석한 단백질 A를 10 uL/분으로 5분간 주입; c) 1 M 에탄올아민 (pH 8.5)를 7분간 주입;을 사용하여 Flow-Cell 1-2에 고정시켰다. rshRANKL (MW 57.9 kDa)는 BIAcore 작용 버퍼를 사용하여 원하는 농도로 희석하였다. 5가지 다른 rshRANKL 희석액 (1.0415 nM, 2.083 nM, 4.166 nM, 8.333 nM, 16.666 nM)은 친화도 측정에 사용되었다. 6가지 다른 rshRANKL 희석액 (0.7359 nM, 1.4719 nM, 2.94375 nM, 5.8875 nM, 11.775 nM, 23.55 nM)은 데노수맙 친화도 측정에 사용되었다. 데노수맙은 BIAcore 작용 버퍼를 사용하여 최종농도 0.8 μM로 희석하였다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 샘플은 BIAcore 작용 버퍼를 사용하여 최종농도 37 nM로 희석하였다.

[0071] 분석 프로토콜:

[0072] 분석은 제조사 프로토콜 샘플실 온도 (manufacturer's protocol Sample compartment temperature)에 따라 25℃에서 수행하였다.; 데이터 수집 속도-1 Hz; 유속-30 uL/분; rshRANKL의 5가지 다른 농도는 hOPG-hIgG1-Fc 펩티드 평가 (4.166 nM 희석액은 2번 측정); rshRANKL 리간드의 6가지 다른 농도는 데노수맙 평가에 사용하였다. 모든 측정은 다음과 같이 수행하였다: 180초 접촉시간으로 데노수맙/ hOPG-hIgG1-Fc 캡쳐; 3600초 동안 작용 버퍼로 해리; 70초 동안 재생 버퍼를 사용하여 재생.

[0073] Biacore X100 평가 소프트웨어는 각 샘플에 대한 동력학 결합 (ka) 및 해리 (Kd) 상수, 평형 해리 상수 (KD) 및 최고 RANKL 결합 수준 (R_{max})을 측정하는데 사용하였다. 모델 파라미터는 데이터에 대해 랑뮤어 결합 모델이 1:1이 되도록 하여 독립적으로 각 샘플에 대하여 측정하였다.

[0074] 각기 다른 RANKL 농도에서의 데노수맙의 결합 및 해리 곡선은 도 1에 나타내었다. 각 곡선에 대한 상관 데이터는 표 1에 나타내었다. Biacore X100 평가 소프트웨어를 통해 측정된 데노수맙-RANKL 결합의 모델 파라미터는 표 2에 나타내었다.

[0075] RANKL 에 결합하는 항-RNAKL 항체 데노수맙의 친화도 (KD)는 제조사의 데이터와 일치한 2.6×10^{-11} M 이였다.

[0076] [표 1]

[0077] 데노수맙-rshRANKL 결합에 대한 상관 데이터

Curve	Conc (M)	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)
Cycle: 5 0.7359 nM	7.359E-10	30	1.07346E+18	2.729222012
Cycle: 6 1.4719 nM	1.4719E-09	30	1.07346E+18	4.866918331
Cycle:7 2.94375 nM	2.94375E-09	30	1.07346E+18	6.830413213
Cycle: 8 5.8875 nM	5.8875E-09	30	1.07346E+18	5.581231192
Cycle: 9 11.775 nM	1.1775E-08	30	1.07346E+18	2.692233789
Cycle: 10 23.55 nM	2.355E-08	30	1.07346E+18	-1.728466535

[0078]

[0079] [표 2]

[0080] 데노수맙-rshRANKL 결합을 측정하는데 사용한 모델 파라미터

k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max} (RU)	t_c	Chi^2 (RU^2)	U-value
235360.1515	6.21706E-06	2.64151E-11	562.403892	3.45471E+17	8.62705	11.64904

[0081]

[0082] rshRANKL의 다른 농도별 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 결합 및 해리 커브는 도 2에 나타내었다. 각 커브의 상관 데이터는 표 3에 나타내었다. Biacore X100 평가 소프트웨어를 이용하여 측정한 hOPG-hIgG1-Fc-RANKL 결합의 모델 파라미터는 표 4에 나타내었다.

[0083] RANKL에 결합하는 hOPG-hIgG1-Fc의 affinity (KD)는 4.85×10^{-13} M 이였다.

[0084] [표 3]

[0085] hOPG-hIgG1-Fc-RANKL 결합의 각 커브에 대한 상관 데이터

Curve	Rmax (RU)	Conc (M)	Flow (ul/min)	RI (RU)	kt (RU/Ms)
Cycle: 5 1.0415 nM	44.96516	1.04E-09	30	-1.0584	4.33E+08
Cycle: 6 2.083 nM	87.28024	2.08E-09	30	-6.8384	4.33E+08
Cycle: 7 4.166 nM	205.2188	4.17E-09	30	-23.1182	4.33E+08
Cycle: 8 8.333 nM	567.9522	8.33E-09	30	-29.2618	4.33E+08
Cycle: 9 16.666 nM	639.3375	1.67E-08	30	-4.20587	4.33E+08
Cycle: 11 4.166 nM	218.8427	4.17E-09	30	-20.7052	4.33E+08

[0086]

[0087] [표 4]

k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t_c	Chi^2 (RU^2)	U-value
13476795.16	6.54E-06	4.85E-13	1.39E+08	5.541974	5.30225

[0088]

[0089] 따라서, rhsRANKL에 결합하는 서열번호: 1의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 친화도 (KD)는 약 4.9×10^{-13} M 이였고, 실질적으로 유사한 실험 조건에서 약 2.6×10^{-11} M 로 측정되는 시중의 데노수맙에 비해 약 50배 높은 것이다.

[0090] **실시예 3:** hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 제형 (formulation) 안정성 연구

[0091] 서열번호: 1의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드를 앞서 기본적으로 개시된 대로 발현 및 정제하였다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 장기간 안정성 연구 (Long-term stability study)는 2-8℃에서 제품 (product) 안정성 예측 (estimate)을 수행하였다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 가속 안정성 연구 (accelerated stability study)는 서로 다른 조성의 제형 버퍼에서 제품 안정성을 평가하기 위해 40℃에서 수행하였다. 폴리펩티드 안정성은 SEC HPLC

로 분석하였다. SEC HPLC 크로마토그램의 통합 (Integration)은 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 단량체 (monomers), 응집체 (aggregates) 및 분해 제품 (degradation products)의 평가 및 단백질 조성의 변화를 모니터링하기 위해 수행하였다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드를 스크류 캡으로 닫힌 바이알 (screw capped vials)에 분주하였다 (aliquoted). 분취물 (aliquots)은 지정된 온도에서 어두운 곳에 요구되는 시간의 기간 (required periods of time) 동안 보관하였다.

[0092] 재료 및 장치:

[0093] 모든 시약 (reagents)은 적어도 HPLC 등급을 사용하였다: Milli-Q 워터 (또는 등가물); 염화나트륨 (JT Baker); 이염기성 인산나트륨 (Sodium 포스페이트 Dibasic), 헵타하이드레이트 (Heptahydrate)($Na_2HPO_4.7H_2O$, JT Baker) 또는 이염기성 인산나트륨 무수물 (Sodium 포스페이트 Dibasic Anhydrous)(Na_2HPO_4, JT Baker); 6 N 염산 (Hydrochloric Acid)(JT Baker); 수산화나트륨 (Sodium Hydroxide) 6 N NaOH(BDH); 아지드나트륨 (Sodium Azide)(Sigma Aldrich); 메탄올 (JT Baker); rhsRANKL(Alphamab, Inc.); 염소 항-인간 IgG:HRP 콘쥬게이트 (goat anti-human IgG:HRP conjugate)(Perkin-Elmer).

[0094] pH 미터 (pH Meter)(Coming Pinnacle 542); 분석 저울 (Analytical Balance)(Mettler Toledo XS603S); PDA 및 엠파워 소프트웨어를 갖는 워터 HPLC 시스템 (Waters HPLC System with PDA and Empower Software); YMC-Pack Diol 300, 6.0 mm ID × 30 cm, (YMC 카탈로그 넘버 (Catalog Number) DL06S053006WT); G2000 SWxl, 7.5 mm × 300 mm (TOSOH Bioscience); TSK Guard SW, 7.5 mm × 75 mm (TOSOH Bioscience); 2 ㎛ 프릿을 갖는 인라인 필터 (Inline Filter with 2 ㎛ Frit)(VWR 카탈로그 넘버 21511-442); 교체의 (replacement) 2 ㎛ 프릿 (Frit)(VWR 카탈로그 넘버 21511-423); 필터, PES, 1000 mL (Nalgene, 카탈로그 넘버 567-0020); 토탈 리커버리 바이알 (Total Recovery Vial), PTFE/실리콘 셉타를 갖는 스크류 탑 12 × 32 mm 캡 (screw top 12 × 32 mm cap with PTFE / Silicone septa)(Waters); 접합된 프리-슬릿 PTFE/실리콘 셉타를 갖는 캡/셉타 12 × 32 스크류 넥 (Cap/Septa 12 × 32 screw neck with bonded pre-slit PTFE/Silicone septa)(Waters).

[0095] 버퍼 (Buffers):

[0096] 이동상 버퍼 (Mobile Phase buffers):

[0097] 100 mM Na포스페이트, YMC-Pack Diol 300 컬럼 (column)을 위한 200 mM NaCl pH 7.0 (PBS)

[0098] 20 mM Na포스페이트, 300 mM NaCl, pH 7.4 버퍼. 여과 및 탈기된 (Filtered and degassed) G2000SWxl 컬럼

[0099] 약물 제형 (drug formulation) 버퍼는 다음과 같이 준비하였다:

[0100] 1. 25 mM Na포스페이트, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl (L-Arginine HCl), 10 mg/mL 수크로스, pH 6.3

[0101] 2. 25 mM Na포스페이트, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 수크로스, pH 6.8

[0102] 3. 20 mM 히스티딘 (Histidine), 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 만니톨 (Mannitol), pH 6.8

[0103] 4. 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, pH 6.8

[0104] 5. 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, 0.1 mg/mL 메티오닌 (Methionine), pH 6.8

[0105] 6. 20 mM 히스티딘, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 만니톨, pH 6.3

[0106] 7. 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, pH 6.3

[0107] 8. 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, 0.1 mg/mL 메티오닌, pH 6.3

[0108] 과정(Procedures):

[0109] 1 mg/mL 또는 2 mg/mL의 단백질 농도로 도달시키기 위하여 샘플을 이동상으로 희석하였다.

[0110] 크로마토그래피 파라미터(Chromatography parameters):

[0111] 유량 (Flow Rate): 0.5 ml/분

[0112] 컬럼 온도: 25 ± 3℃

[0113] 오토샘플러 (Autosampler) 온도: 5 ± 3℃

[0114] 주입 부피 (Injection Volume):

[0115] 2 mg/mL의 폴리펩티드 농도를 갖는 샘플의 경우 15 ㎕

[0116] 1 mg/mL의 폴리펩티드 농도를 갖는 샘플의 경우 25 ㎕

[0117] 탐지기 파장 (Detector Wavelength):

[0118] 2 mg/mL의 폴리펩티드 농도를 갖는 샘플의 경우 280 nm

[0119] 1 mg/mL의 폴리펩티드 농도를 갖는 샘플의 경우 214 nm

[0120] 작동 시간 (Run Time): 35분

[0121] 두 벌 (two lots)의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 각각의 제조물 (preparations)을 테스트하였고, 둘 모두는 약 10 mg/mL 단백질 농도에서 25 mM Na포스페이트, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 수크로스, pH 6.3으로 제제화된 것이었다.

[0122] hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 다른 두 벌의 제조물에 대한 2-8℃ 안정성 연구는 하기 표 5 및 표 6에 요약하였다.

[0123] [표 5]

[0124] 안정성 연구 시점에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 조성

[0125]

Sample	Composition	Time points (days)		
		0	67	176
Lot No 1	Monomer (%)	94.3	94.4	93.9
	Aggregates (%)	0.6	1.3	1.3
	Degradation products (%)	5.1	4.3	4.8

[0126] [표 6]

[0127] 안정성 연구 시점에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 조성

[0128]

Sample	Composition	Time points			
		1 day	4 weeks	9 weeks	12 weeks
Lot No 2	Monomer (%)	98.1	97.2	97.2	97.1
	Aggregates (%)	0.38	0.43	0.2	0.56
	Degradation products (%)	1.5	2.4	2.6	2.4

[0129] [표 7]

[0130] 가속 안정성 연구 시점에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 조성 (제형 버퍼 F1-F8)

[0131] F1 - 25 mM Na포스페이트, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 수크로스, pH 6.3

[0132]

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.6	94.2	91.4	87.3	83.7
	Aggregates (%)	0.8	1.6	3.2	4.9	6.3
	Degradation products (%)	2.6	4.2	5.4	7.8	10.0

[0133] F2 - 25 mM Na포스페이트, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 수크로스, pH 6.8

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.8	92.6	89.1	83.4	83.7
	Aggregates (%)	0.6	2.1	4.1	6.3	6.3
	Degradation products (%)	2.6	5.3	6.8	10.3	10.0

[0134]

[0135] F3 - 20 mM 히스티딘, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 만니톨, pH 6.8

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.6	94.2	91.3	88.3	84.8
	Aggregates (%)	0.6	1.5	2.4	3.2	3.7
	Degradation products (%)	2.8	4.3	6.3	8.5	11.5

[0136]

[0137] F4 - 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, pH 6.8

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.6	94.3	91.2	88.2	86.4
	Aggregates (%)	0.6	1.6	2.4	3.8	3.8
	Degradation products (%)	2.8	4.1	6.4	8.0	9.8

[0138]

[0139] F5 - 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, 0.1 mg/mL 메티오닌(Methionine), pH 6.8

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.8	94.3	85.8	87.7	86.7
	Aggregates (%)	0.6	1.5	2.1	2.3	3.1
	Degradation products (%)	2.6	4.2	12.1	10.0	10.2

[0140]

[0141] F6 - 20 mM 히스티딘, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 만니톨, pH 6.3

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.8	94.4	93.4	88.7	88.1
	Aggregates (%)	0.6	1.4	1.9	2.3	2.2
	Degradation products (%)	2.6	4.2	4.7	9.0	9.7

[0142]

[0143] F7 - 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, pH 6.3

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.8	94.4	93.0	91.2	87.9
	Aggregates (%)	0.6	1.4	1.8	3.0	2.9
	Degradation products (%)	2.6	4.2	5.2	5.8	7.2

[0144]

[0145] F8 - 20 mM 히스티딘, 50 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 25 mg/mL 만니톨, 0.1 mg/mL 메티오닌, pH 6.3

Sample	Composition	Time points (days)				
		0	7	14	21	28
Lot No 2	Monomer (%)	96.4	95.0	92.8	91.0	88.6
	Aggregates (%)	0.6	1.3	1.8	2.1	2.0
	Degradation products (%)	3.0	3.7	5.4	6.9	9.4

[0146]

[0147] 표 7에 요약된 결과에서 명백한 것은, 제형 버퍼에 10 mg/mL까지의 만니톨의 추가는 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 조성 안정성을 향상시켰다. 그러나, 제형 버퍼에 6.3부터 6.8까지의 pH 증가는 제품 안정성에 영향을 미치지 않으며, NaCl 농도에서도 변하지 않았다.

[0148] Lot No 2 제조물의 안정성을 또한 상온 (room temperature, RT)에서 테스트하였다. 제조물을 0.9% NaCl로 희석하였고, 각각 0.6, 1.2, 1.8 mg/mL의 총 단백질 농도를 갖도록 하였다. 샘플을 상온에서 24시간 동안 보관하였고, 0 hr 시점 및 24 hr 시점에서 분석하였다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 조성 안정성을 단백질 조성의 강도 및 ELISA를 모니터하는 SEC HPLC로 분석하였고, RANKL에 대한 표준 시료 (reference standard) 결합의 70-130%의 허용 기준 (acceptance criteria)으로 RANKL에 대한 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 결합을 평가하였다. 연구의 결과는 표 8에 요약하였다.

[0149] [표 8]

[0150] RT 안정성 연구 시점에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 조성

	Control 10mg/mL		0.6mg/mL		1.2mg/mL		1.8mg/mL	
	0 hr	24 hr	0 hr	24 hr	0 hr	24 hr	0 hr	24 hr
Monomer (SEC-HPLC)	95.12%	94.63%	94.19%	93.56%	95.08%	94.29%	95.04 %	94.57%
Binding Activity (ELISA)	94.9%	-	88.8%	94.10%	89.3%	79.40%	88.6%	115.60%

[0151]

[0152] 표 8에 요약된 결과에서 명백한 것은, hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 10 mg/mL 스톡 (stock)을 0.6 mg/mL, 1.2 mg/mL 및 1.8 mg/mL으로 희석하고, 상온에서 24시간 동안 보관하면 조성의 강도 및 결합 활성은 표준 시료와 유사해진다는 것을 입증하였다.

[0153] 따라서, 상기 데이터를 통해 약물 제조 및 정맥 내 투여를 위한 충분한 시간 동안 후에 재구성된 (post-reconstituted) hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 용액의 안정성을 확인하였다.

[0154] Lot No 2의 장기간 안정성 (Long-term stability)을 2-8℃에서 테스트하였다. 이 연구의 결과는 표 9에 요약하였다.

[0155] [표 9]

[0156] hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 2-8℃ 장기간 안정성 연구 결과

Assays	Test Method	Specification	T = 0	T= 3 months	T= 6 months
Appearance	999-GMP-064	Clear, colorless, free of visible particles	Clear, colorless, free of visible particles	Clear, colorless, free of visible particles	Clear, colorless, free of visible particles
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
Coomassie Reduced	774-01-004	Conforms to reference standard	Conforms to reference standard	Conforms to reference standard	Conforms to reference standard
Coomassie Non-Reduced	774-01-004	Conforms to reference standard	Conforms to reference standard	Conforms to reference standard	Conforms to reference standard
RankL ELISA	774-01-009	70 - 130%	100%	89%	81%
IEF	774-01-007	FIO, report pI range and number of bands	16 bands; pI range 6.0-8.0	11 bands; pI range 6.0-7.8	11 bands; pI range 6.0-7.8
SEC-HPLC	774-01-002	≥ 92% monomer	96% monomer	97% monomer	97% monomer
Osmolality	999-GMP-024	280 - 350 mOsm/kg	298 mOsm/kg	301 mOsm/kg	300 mOsm/kg
Endotoxin	774-01-028	≤ 0.25 EU/mg	< 0.04 EU/mg	N/A	N/A
Bioburden	999-GMP-484	≤ 3 CFU/10mL with no objectionable organisms	< 1 CFU/10mL with no objectionable organisms	N/A	N/A

[0157]

[0158] 표 8에 요약된 결과에서 명백한 것은, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 10 mg/mL 수크로스, pH 6.3으로 제형화된 서열번호: 1의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드는 10 mg/mL에서 구조적 안정성 및 구체적인 활성을 적어도 6개월 동안 유지하였다.

[0159] **실시예 4**: 영장류에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 단일 용량 (Single dose)의 약동학 (Pharmacokenetics) 연구

[0160] 0.3, 3, 10, 30 및 100 mg/kg의 용량 수준 (dose level)으로 피하 주입 또는 0.3, 3 및 10 mg/kg의 용량 수준으로 정맥 내 주입 통해 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 단일 용량을 받은 12 마리의 사이노몰거스 원숭이 (Synomolgus monkey) (수컷 6 마리 및 암컷 6 마리)로, 피하 및 정맥 내 (볼러스) 주입에 따른 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 약동학 프로파일 및 최대 내성 용량 (maximum tolerated dose)을 연구하였다. 피하 투여 (dosing)는 1 mL/kg의 용량 부피 (dose volume)로 이루어진 반면, 정맥 내 투여는 2 mL/kg의 용량 부피로 이루어졌다. 상기 실험 물질의 농도는 9.73 mg/mL 이었으며, 고용량 수준 (higher dose level)을 위하여 상기 용량 부피는 상기 표적 용량 수준 (target dose level)을 달성하기 위하여 조정되었다 (동물 체중에 좌우됨).

[0161] 요구되는 투여 농도 (dose concentration)에 대한 시험 물질의 준비를 위하여 다음의 담체 (vehicle)가 이용되었다; 포뮬레이션 버퍼 (formulation buffer)(1% w/v의 수크로스, 100 mM의 염화나트륨, 20 mM의 L-아르기닌 염산염 (L-Arginine Hydrochloride), 25 mM의 탄산수소나트륨 (Sodium Bicarbonate), 6.3의 최종 조절된 pH (final adjusted pH)). 상기 담체는 냉장 보관되었으며, 준비 후 1주일 이내에 사용되었다.

[0162] 실험이 시작된 당시, 상기 동물은 약 2 내지 4세의 수명 및 약 2 내지 4kg의 체중을 가졌다. 하루 두 번 상기 동물의 임상 증상 (clinical sign)을 관찰하였다. 각각의 용량 증가 (dose escalation)에 앞서 체중을 기록하였다. 실험이 진행되는 동안 사료 소비량 (food consumption)은 육안으로 평가하였다. 혈액학 (haematology)의 임상 병리학적 조사 (clinical pathology investigation) 및 임상 화학을 위하여, 임상 1회의 사전 평가 (pre-trial) 및 각각의 용량 수준 이후 24시간에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0163] 초기에 상기 동물을 두 투여 그룹 (2 dose group)으로 나누었으며 다음과 같이 처리하였다.

Route of Administration	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Animals	
				Male	Female
Subcutaneous injection	0.3	0.3	1	1	1
	3	3	1	1	1
	10	9.73	1	1	1
Intravenous (bolus) injection	0.3	0.15	2	1	1

[0164]

[0165] 이후, 상기 동물에 다음과 같이 투여하였다.

Route of Administration	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose volume (mL/kg)	No. of Animals	
				Male	Female
Subcutaneous injection	10	4.85	2.06	1*	1*
	30	9.73	3.08	1**	1**
Intravenous (bolus) injection	3	1.5	2	1*	1*
	10	5	2	1**	1**

[0166]

[0167] * 사전적으로 0.3 mg/kg의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 투여된 동물, ** 순수 동물 (Naive animals)

[0168] 두 마리의 동물 (2 animals)에 대한 추가적인 피하 투여는 간 효소 활성을 평가하기 위하여 이루어졌으며 (즉, 아스파르트산 아미노기전달효소(Aspartate Aminotansferase), 알라닌 아미노기전달효소 (Alanine Aminotransferase) 및 젖산탈수소효소 (Lactate Dehydrogenase)), 용량은 다음과 같다:

Route of Administration	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Animals	
				Male	Female
Subcutaneous injection	10	4.85	2.06	1***	1***

[0169]

[0170] *** 피하 경로를 통해 사전적으로 0.3 mg/kg의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 투여된 동물

[0171] 두 마리의 동물은 용량 관찰 기간 후 2주 뒤에 100 mg/kg의 1 회 피하 주입을 받았다. 간 효소 활성에 대한 혈액 샘플을 수집하였다.

Route of Administration	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Animals	
				Male	Female
Subcutaneous injection	100	9.73	10.3	1	1

[0172]

[0173] 두 동물 모두 피하 경로를 통한 0.3 및 10 mg/kg, 정맥내 경로를 통한 0.3 및 3 mg/kg의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 사전적으로 각각 투여되었다.

[0174] 각 용량 증가의 지정된 시점에서 약동학적 조사를 위한 혈액 샘플을 수집하였다.

[0175] 윈논린® (WinNonlin®)의 피닉스™ (Phoenix™)(파사이트 코포레이션 (Pharsight Corporation)으로부터의 버전 6.1)를 사용한 비구획적 방법 (non-compartmental method)을 사용하여, hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 플라즈마 수준에 대한 약동학적 분석에 착수하였다. 관찰된 개별적인 수치로부터 Co (T = 0일 때 정맥 주입에서의 추론 농도), C_{max} (피하 주입에서의 최대 농도)를 얻었다. 혼합 대수-선형 회귀 (mixed logarithmic-linear regreesion)로 AUC_{last} (마지막 데이터 지점에서의 곡선 아래의 면적 (Area Under the Curve to the last data point)을 결정하였다.

[0176] PK 데이터로부터의 결과는 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 C_{max}가 0.3, 3, 10, 30 mg/kg의 용량 수준의 피하 주입 후 약 6 내지 8시간에, 0.3 및 3 및 10 mg/kg의 용량 수준의 정맥내 주입 후 약 1시간에 나타남을 보여주었다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 클리어런스 (clearance)는 정맥내 및 피하 경로 투여로부터 약 168시간 후에 나타났다.

[0177] 피하 (SC) 경로의 경우, 최저 용량 (0.3 mg/kg) 및 동물 0590 (3 mg/kg) 각각에서 관찰된 1시간 및 2시간의 T_{lag}에서 보듯이 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 항상 즉시 흡수되는 것은 아니었다. 3 및 10 mg/kg 용량 값에 근거하는, 정맥내 및 피하 경로에 대한 약 55시간 및 45시간의 T_{half}와 함께, 상기 T_{half} 값은 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 제거가 상대적으로 느리다는 것을 나타냈다. 정맥내 (IV) 경로의 경우, 상기 T_{half} 는 27.5시간 내지 57.8시간으로 분포하였고, 피하내 경로에서는 35.5시간 내지 53.3시간으로 분포하였다. 상기 제거 속도는 투여 속도와 동시에 증가됨 (concomitant increase)을 보이지 않았다. 상기 제거는 두 경로에서 유사했다. 정맥내 및 피

하 경로에서, Cl 및 V_d는 투여 용량에 관계없이 유사했다. 정맥내 경로에서, 상기 Cl 및 V_d는 각각 0.75 내지 1.22 mL/h/kg 및 48.3 내지 76.6 mL/kg의 범위를 이루었다. 피하 경로에서 상응하는 범위는 0.97 내지 1.69 mL/h/kg 및 65.3 내지 94.6 mL/kg이었다. Cl 및 V_d는 용량이 증가함에 따라 증가되지 않았다. 상기 결과는 상기 T_{half}, Cl 및 V_d가 투여용량에 독립적임을 나타낸다. hOPG-hIgG1-Fc에 대한 노출의 선형성 (linearity)은 오직 선형 회귀 (linear regression)로부터의 C_{max} 및 AUC_{last}에 의해 피하 경로에 대하여 도표로서 결정되었으며, 이는 도 4에 나타내었다. 노출값 (Exposure)은 선형적으로 증가하였는데, AUC_{last} 및 C_{max}에 대한 R^2는 각각 0.96 및 0.98이다.

[0178] SC 경로의 경우, C_{max} 값에 근거할 때, 용량 비례값 (dose proportionality)이 관찰될 수 있는 것으로 보였다 (도 5). 용량에 의해 수정된 평균 C_{max}는 0.3, 3 10 및 30 mg/kg 용량에 대하여 각각 6410, 11309, 10409 및 11739 (ng/mL)/(mg/kg)이었다. 용량 비례는 3부터 0.3 mg/kg 용량으로 명확하게 증명되었다. 상기 노출값 (exposure)은 다른 세 용량과 비교할 때 0.3 mg/kg 용량 사이의 비례값 보다 더욱 증가하였다. 실제로, 0.3 내지 3 mg/kg 사이에서 10배의 용량 증가, 0.3 내지 10 mg/kg 사이에서 33.3배 증가 및 0.3 내지 30 mg/kg 사이에서 100배 증가에 대하여, 각각 C_{max}는 17.6, 54.1 및 183.1배 증가하였다. 상응하는 AUC_{last} 값은 각각 82.3, 249.5 및 1095.1이며, 이는 용량 비율에 비하여 노출값이 약 10배 증가하였음을 나타내었다.

[0179] 3 내지 10 mg/kg 사이에서, 상대적 용량 비례값은 C_{max}/D 및 AUC_{last}/D에 근거하여 나타났으며, 이는 이론적 용량 비율 (theoretical dose ratios)에 가까운 상기 용량 비례값 계산에 의해 확인되었다.

[0180] 정맥 내 경로에서, 노출값은 용량 비례값보다 약간 증가했으며, 용량이 3.3배 증가함에 따라 AUClast 및 Cmax가 각각 4.3 및 4.1배 증가했다.

[0181] 따라서, AUC_{last} 및 C_{max}는 상대적으로 용량-비례적인 오직 3 내지 30 mg/kg의 노출값에 따라 연속적으로 증가했다 ($R_2 \approx 1.0$). 상기 결과는 조직상의 (systemic) 노출값이 피하 투여 후 3 내지 30 mg/kg까지의 용량 증가에 따라 거의 비례적으로 증가했음을 나타낸다.

[0182] 3 및 10 mg/kg과, 3 및 10 mg/kg에서 대표적인 88.6% 및 59.2%에서 획득한 평균값을 이용하여 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 생체이용율 (bioavailability)을 측정하였다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드는 10 mg/kg (59.2%)에 비해 3 mg/kg (88.6%)에서 우수한 생체이용율을 가지는 것으로 보였다.

[0183] 따라서, 본 연구의 결과에서 명백하듯이, 모든 동물은 측정된 두 가지 투여 경로로 모든 투여 용량으로 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드에 노출되었다. 피하 주입 이후, hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 (AUC_{last} and C_{max})에 대한 조직 노출값이 용량의 증가에 따라, 오직 3 내지 30 mg/kg인 상대적으로 용량-비례적인 노출값과 함께 연속적으로 증가했다. 제거 속도는 용량 증가에 영향을 받지 않았으며, 두 경로에서 유사하게 나타났다. Cl 및 V_d는 투여 경로에 관계없이, 투여 용량과 무관하게 유사하게 나타났다. 상기 결과는 T_{half}, Cl 및 V_d가 투여 용량에 독립적임을 보여준다. 본 결과는 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 10 mg/kg (59.2%)에 비하여 3 mg/kg (88.6%)에서 더 우수한 생체이용율을 가지는 것을 나타낸다.

[0184] 영장류에서 피하 및 정맥내 일회량 투여 이후 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드에 대한 평균 플라즈마 약동학적 파라미터 (mean plasma pharmacokinetic parameter)를 하기 표 9에 요약하였다.

[0185] [표 9]

[0186] 영장류에서 피하 및 정맥내 일회량 투여 이후 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드에 대한 평균 플라즈마 약동학적 파라미터의 요약

Species	Route	Dose	AUC (ng.h/mL)	Cmax (ng/mL)	$T_{1/2}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V (mL/kg)
Cynomolgus monkeys	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
Cynomolgus monkeys	IV	3mg/kg	2647530	112132	42.6	1.07	62.4
		10mg/kg	11256849	460319	54.9	0.78	61.5

[0187]

[0188] *NC: 계산되지 않음

[0189] 실시예 5: 영장류에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 반복 투여량 약동력학 연구

[0190] 반복 투여량 약동력학 분석은 각각 메인 그룹과 2주 연속으로 주당 2회씩 0, 0.3, 3 및 10 mg/kg (n=3마리/성별/그룹)을 피하 투여 처리된 회복 그룹에서 3마리의 수컷과 3마리의 암컷으로 이루어진 네 그룹의 사이노몰구스 원숭이들의 독물동력학 연구를 진행하는 동안 완료되었다. 독물동력학 분석은 오직 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 주입된 동물들에서만 진행되었다.

[0191] 혈장 수준의 독물동력학 분석은 Phoenix™ for WinNonlin® (version 6.1, Pharsight Corporation)을 이용하여 비구획적 방법 (동역학의 일수마다, 1일차와 13일차)을 통해 진행되었다. 따라서, 약동력학적 매개변수는 각각 1일차와 13일차에 투여가 완료된 후 비교되었다.

[0192] 본 연구는 하기한 것과 같다. 통제 그룹 (그룹 1)의 암컷 한 마리와 수컷 한 마리에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 측정되었는데도 해당 그룹에서 수치화할 수 없는 농도가 측정되었다. 모든 동물들은 2주간 주당 2회씩 0, 0.3, 3 및 10 mg/kg 분량의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드에 노출되었다. hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 (평균적 AUC_{72} 및 평균적 C_{max})로부터의 전신적 노출은 수컷과 암컷 모두의 투여량과 함께 증가되었다. 2주 투여 후 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 적당한 축적이 관찰되었다. 투여 기간은 투여량 수준에 의존하지 않았다. C_{max}와 AUC_{72}는 수컷과 암컷 모두 모든 투여량에서의 반복 투여에 따라 증가되었고, 이는 13일차와 1일차 사이의 AUC_{72} 비율로 나타냈다. 이 비율은 0.28부터 2.50의 범위로 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 적당한 혈장 축적이 확인되었다. 이 축적은 투여량에 따라 증가되었다. 개인간 다양성보다 높은 성별 효과는 나타나지 않았다. 결론지을 수 있는 뚜렷한 성별 차이도 없었으며 이는 수컷과 암컷 사이에 차이가 없다는 것으로 판단될 수 있었다. 성별 차이 측면에서 노출은 수컷과 암컷 모두 0.3부터 10 mg/kg의 농도 차이에 걸쳐서 비슷했다. 1일차와 13일차에 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드로부터의 전신적 혈장 노출이 0.3과 10mg/kg 사이에서 양쪽 성별 모두 투여량에 비례한 것보다 증가되었다. 1일차를 제외하고 AUC_{72}와 관련하여 중간 투여량 및 낮은 투여량 사이의 암컷들과 C_{max}를 기반으로 한 높은 투여량과 낮은 투여량 사이의 수컷들에서 투여량의 비례성은 관찰되지 않았다. 13일차에, 혈장 노출의 증가는 높은 수준에서 목표로 한 투여 비율의 최소 5배 이상이었다.

[0193] 영장류의 반복 투여량 피하 투여 후 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드를 위한 평균 혈장 약동력학적 매개변수는 아래 표 10에 요약되어 있다.

[0194] [표 10]

[0195] 2주간 주 2회 피하 투여 후 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드를 위한 수컷 및 암컷 사이노몰구스 원숭이들의 평균 혈장 약동력학적 매개변수의 요약 (N=3/성별/투여 그룹)

Dose (mg/kg)	0.3		3		10	
Occasion	Day 1					
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
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	
Dose Ratio	10 (I/L)		3.33 (H/I)		33.3 (H/L)	
AUC_{72} Ratio	5.91	13.57	5.54	4.75	32.8	64.5
C_{max} Ratio	3.21	9.80	5.12	4.76	16.44	46.71
Occasion	Week 2 (Day 13)					
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
Dose Ratio	10 (I/L)		3.33 (H/I)		33.3 (H/L)	
AUC_{72} Ratio	24.44	32.16	7.22	5.30	176.4	170.3
C_{max} Ratio	17.56	27.98	7.32	5.47	128.51	152.96
R_{ac} (day 13 / day 1)	0.28	1.07	1.76	2.11	2.50	2.39

[0196]

[0197] **실시예 6**: 사람의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 단일 투여량 약동력학 연구

[0198] 피하 투여에 따른 서열번호: 1의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 약동력학적 프로필은 10mg, 30mg 그리고 60mg의 투여량을 피하 투여를 통해 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 단일 투여를 받은 건강한 남성 지원자들 (19-39세)에서 연구되었다. 약 10 mg/ml의 총 단백질 농도에서 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드가 사용된 약제는 pH 6.3에서 25 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 25 mM L-아르기닌 염산염, 10 mg/ml 수크로스로 만들어졌다. 실험된 세 가지 투여량을 위한 투여 후 다양한 시간대에서의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 혈액 수준이 표 11-13에 요약되었다. 이 결과는 사람 대상의 체순환에서 연구 하에 약물의 중대한 피하 투여 후 생물학적 이용도를 나타낸다.

[0199] [표 11]

[0200] 단일 10mg 투여량의 피하 투여 후 건강한 지원자의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 혈액 수준

Time Point (Hours)	hOPG-hIgG1-Fc polypeptide (ng/mL) per subject ID							
	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 denotes that value obtained is below Lowest Limit of Quantification (1.683 ng/mL) ** Values were obtained for all time points, however were all below Lowest Limit of Quantification (1.683 ng/mL), thus cannot be reliably quantitated.							

[0201]

[0202] [표 12]

[0203] 단일 30mg 투여량의 피하 투여 후 건강한 지원자의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 혈액 수준

Time Point (Hours)	hOPG-hIgG1-Fc polypeptide (ng/mL) per subject ID							
	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 denotes that value obtained is below Lowest Limit of Quantification (1.683 ng/mL)							

[0204]

[0205] [표 13]

[0206] 단일 60mg 투여량의 피하 투여 후 건강한 지원자의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드 혈액 수준

Time Point (Hours)	hOPG-hIgG1-Fc polypeptide (ng/mL) per subject ID							
	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 denotes that value obtained is below Lowest Limit of Quantification (1.683 ng/mL)							

[0207]

[0208] **실시예 7**: hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 인간 조직에 결합되는 특성 연구

[0209] 면역조직화학 (IHC)의 목적은 서열번호: 1의 hOPG-hIgG1-Fc 폴리펩티드의 조직 결합 특성을 결정하고, 상업적으로 이용가능한 치료제 (Prolia)의 패턴 결합과 비교하기 위한 것이다. 상업적으로 가능한 TNF-α 결합된 치료적 에타너셉트 (therapeutic etanercept)는 이소형 대조군 (isotype control)으로서 사용되었다.

[0210] 방법

[0211] 적정 실험은 최소한의 배경 및 신호의 최대 탐지로 농도를 설정하기 위해 3개 단백질 치료제 (therapeutic)인 hOPG-hIgG1-Fc-FITC, 프롤리아 (PROLIA) 및 엔브렐 (ENBREL) (Covance에 의해 수행된 FITC (fluorescein isothiocyanate) 라벨링)로 수행되었다. LifeSpan에 의해 제공된 냉동된 인간 조직에 연속 희석법은 20 μg/ml, 10 μg/ml, 5 μg ml, and 2.5 μg/ml로 수행되었다. 또한, ENBREL은 1.25 μg/ml, 0.6 μg/ml, and 0.3 μg/ml에서 추가로 적정하였다. hOPG-hIgG1-Fc-FITC, PROLIA-FITC, 및 이소형 대조군 치료제인 ENBREL- FITC는 주 결합 시약으로 사용되었고, fuchsia-colored deposit 제조에 사용된 주 검출 시스템은 항-마우스 이차 항체 (Vector, BA-2000), 및 ABC-AP 키트 (AP = alkaline phosphatase secondary, Vector, AK-5000) 레드 기질 키트 (Red substrate kit (Vector, SK-5100)), 및 항-FIRC 마우스 이차 항체 (Sigma-Aldrich, catalog# F5636)로 구성되었다. 조직은 조직 항원이 면역조직화학 분석을 위한 접근 및 보존이 되었는지 확인하기 위해 양성 대조군 항체 (CD31 및 vimentin)로 염색하였다. 음성 대조군은 주요 시약의 부재 또는 일차 시약 및 항-FITC 이차 항체 (모든 사례에서 항-마우스 3차 및 전부 다른 하류 시약을 사용)에 인접하는 부분의 전체 면역조직화학을 수행하는 것으로 구성된다. 슬라이드는 병리학자에 의해 해석되고, 각 시약은 특정 신호의 유무, 배경 레벨 및 문헌에 보고된 표현 결과의 일치에 대해 평가되었다. 염색 정도는 0-4 규모로 기록되었다 (0=음성, 1=블러쉬, 2=희미함, 3=보통, 4=강함). 슬라이드는 니콘 (Nikon) 현미경이 결합된 DVC 13 IOC 디지털 카메라로 촬영하였다. 실험 결과는 하기 표 14에 요약되어 있다.

[0212] [표 14]

[0213] 인간 조직에서 IHC 연구의 결과

Sample	Sex	Age	Tissue	Pathology	Type	CD31/ Vimentin Validation	Cell Type	hOPG-hIgG1 5 ug/ml IHC Score	PROLIA 2.5 ug/ml IHC Score	ENBREL 1.25 ug/ml IHC Score	No Primary With Secondary
1	M	70	Bone Marrow	Normal	Normal	P	Erythroid precursor	0	0	0	0
							Myeloid precursor	2	2-3	0-1	0
							Megakaryocytes	2-3	3	2-3	1
							Macrophages	1-2	2-3	2	0
							Granulocytes	3	3-4	0-1	0
2	M	58	Bone Marrow	Normal	Normal	P	Erythroid precursor	0	0	0	0
							Myeloid precursor	2	2	0	0
							Megakaryocytes	2-3	2-3	1	0
							Macrophages	1-2	2	0	0
							Granulocytes	3	3	0	occ 2
3	M	76	Bone Marrow	Normal	Normal	P	Erythroid precursor	0	0	0	0
							Myeloid precursor	2	2	0-1	0
							Megakaryocytes	2-3	2-3	1	0
							Macrophages	2	2	1	0
							Adipocytes	2	2	2	2
4	M	16	Liver	Normal	Normal	P	Hepatocytes	0	0	0	0
							Bile Duct Epithelium	0-1	0	0	0
							Kupffer Cells	1-2	0-1	0	0
							Other	0	0	0	0
5	M	55	Small Intestine	Normal	Normal	P	Epithelium	0	0	0	0
							Smooth Muscle	0	0	0	0
							Inflammatory Cells	0	0	0	0
							Goblet Mucin, Brush Bo	3	3	3	3

[0214]

[0215] hOPG-hIgG1-Fc-FITC의 결과:

[0216] 5-10 μg/ml의 농도의 hOPG-hIgG1-Fc-FITC는, 흉선 내의 흉선 세포 및 맨틀 영역 포함한 편도선 림프구에서 비정기 (occasional) 중등 염색 (Moderate staining)만 보였다. 중등 염색은 가슴샘소체 (Hassall's corpuscles)에서 보였다. 전립선은 주로 음성을 나타내거나 평활근에서 비정기 블러쉬 염색을 보였다. 고환 내에서 정조세포 (spermatogonia) 및 비정기 정모 세포는 드문 블러쉬 염색을 보였고, 간질 세포에서는 음성을 나타내었다. 자궁은 자궁 근층 평활근에서 블러쉬 염색을 보였고, 난소는 기질 세포에서 블러쉬 염색을 보였다. 태반은 융합세포영양막 (syncytiotrophoblasts)의 보통 염색을 보였으며, 내피 세포 및 비정기 기질 세포에서 보통 염색으로 희미하게 나타났다. 소장은 브러시 테두리의 강한 염색과 술잔 세포 무친 (goblet cell mucin)의 점액 중간에 상피의 블러쉬 염색을 보였다. 혈관 (Vessels), 섬유아세포, 신경절 (ganglia) 및 점막하의 평활근 및 근층은 음성이었다. 간 부분은 간세포의 중간 염색에서 희미하게 보였고, 시누소이드의 라이닝 세포의 비정기 중간 염색에서 희미하게 보였다.

[0217] 프롤리아-FITC의 결과:

[0218] 2.5-5 벡터 g/ml의 농도의 프롤리아-FITC는 편도선의 림프구의 하위 집합, 특히, 림프 여포의 맨틀 영역 내에서 보통부터 가끔 강한 정도까지의 염색을 보여주었다. 그리고 흉선의 수질 림프구의 가끔씩 강한 염색과 함께 흉선 세포의 희미한 정도부터 중간 정도의 염색을 보여주었다. 전립선은 염색에서 음성을 나타내었다. 고환은 정조 세포 (spermatogonia)에서 드문 블러쉬 염색 (blush staining)를 보였으나, 정모 세포 및 간질 세포에서 주로 음성을 나타내었다. 자궁은 자궁 근층의 평활근의 희미한 염색을 보였으며, 난소 부분은 혈관 평활근의 희미한 염색을 보였다. 태반은 융합세포영양막 (syncytiotrophoblasts)의 보통 염색을 보였으며, 내피세포 및 비정기 기질세포에서 보통 염색을 희미하게 보였다. 소장은 브러시 테두리 강한 염색을 중간으로 상피 세포의 희미한 염색을 보여 주었다. 혈관, 섬유아세포, 신경절(ganglia) 및 점막하의 평활근 및 근층은 음성이었다. 간 부분은 간세포의 희미한 염색을 보였다.

[0219] 엔브렐-FITC의 결과:

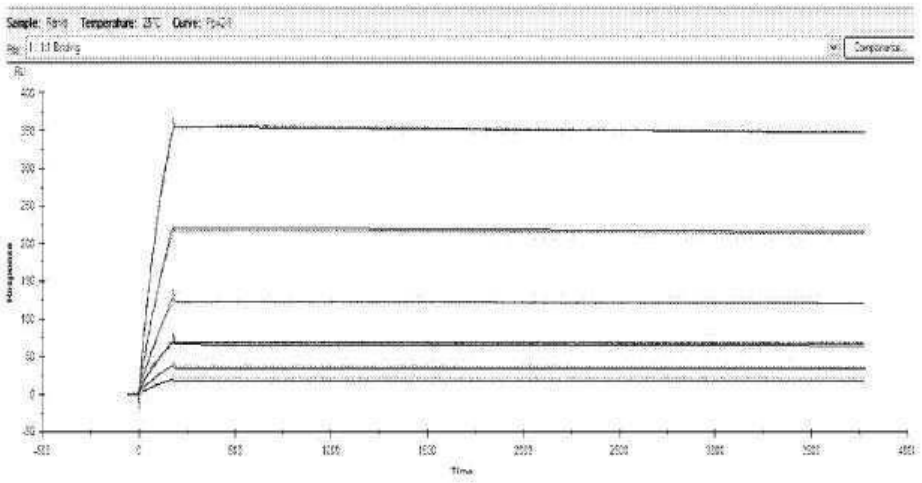
[0220] 1.25 ㎍/ml의 농도의 엔브렐-FITC는 흉선 및 편도선 림프구에서 때때로 강한 멤브레인 염색도 보였다. 전립선은 상피 세포의 중등 염색 및 평활근의 염색이 희미하게 보였다. 태반은 융합세포영양막 (syncytiotrophoblasts)의 부분 집합의 때때로 강한 염색에서 적절하게 보여주었고, 때때로 세포영양막 (cytotrophoblasts)의 보통 염색에서 희미하게 나타났고, 내피세포의 희미한 염색을 나타내었다. 난소 기질은 세포의 약한 염색을 보였다. 자궁 샘플은 자궁 근층의 평활근의 희미한 염색을 보였고, 혈관 내피세포와 혈관 평활근의 대부분은 음성적인 염색을 보였다. 고환 내에서 정조 세포 및 비정기 정모 세포는 보통 염색을 보였고, 간질 세포는 음성을 보였다. 소장은 상피 세포의 보통 염색, 브러시 테두리의 강한 염색 및 점막하 혈관 및 섬유아세포의 음성적인 염색을 보였다.

[0221] 요약하면, 5 μg/ml의 hOPG-hIgG1-Fc-FITC 및 2.5 ㎍/㎖의 프롤리아-FITC는 비장의 적색 펄프 (splenic red pulp)의 시누소이드 (sinusoidal) 내피세포의 양성적인 염색과 함께 편도선 및 흉선의 림프구에서 양성적인 염색을 보여 주었다. 두 시약은 또한 태반 영양세포 (trophoblasts) 및 내피세포에서 양성적인 염색을 보였으며, 자궁의 자궁 근층의 평활근의 희미한 염색은 전립선에서 주로 음성적이었다. 간세포는 두 시약에 양성을 나타냈다. 양성적인 염색을 나타낸 세포 유형은 프롤리아-FITC 및 hOPG-hIgG1-Fc-FITC와 매우 유사하였다. 엔브렐-FITC는 림프구, 태반 영양세포 (trophoblasts), 내피세포와 평활근은 긍정적인 염색을 보였다. 또한, 다른 두 시약 달리 전립선 상피 및 고환의 정세관에서도 양성 염색을 나타내었다. 엔브렐-FITC 염색의 패턴은 서로 유사한 프롤리아-FITC 및 hOPG-hIgG1-Fc-FITC와 달리 차이를 보였다.

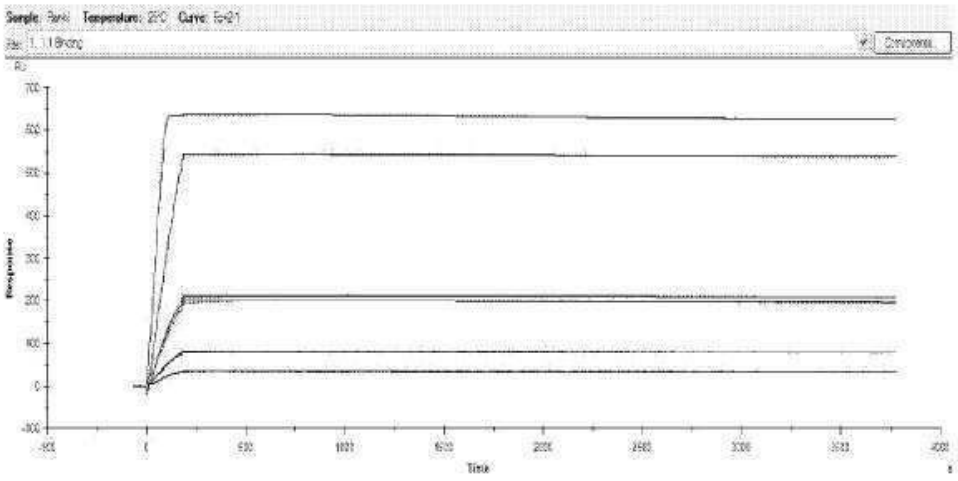
[0222] "프롤리아 (Prolia)", "엑스제바 (Xgeva)" 및 "엔브렐 (Enbrel)"은 암젠사 (Amgen Inc), 델라웨어 법인 (Delaware Corporation)의 등록 상표이다. 각 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 표시되더라도, 모든 문헌 및 본 출원에 언급된 특허는 본 출원에 그 전체가 참조로 인용된다. 요지의 특정 실시예를 설명하였지만, 상술한 명세서는 제한적인 것이 아니라 예시적인 것이다. 많은 변화가 본 명세서의 검토 및 이하의 청구 범위로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 본 발명의 전체 범주는 이러한 변형과 함께, 그들의 전체 균등 범위 및 명세서와 함께 청구 범위를 참조하여 결정되어야 한다.

도면

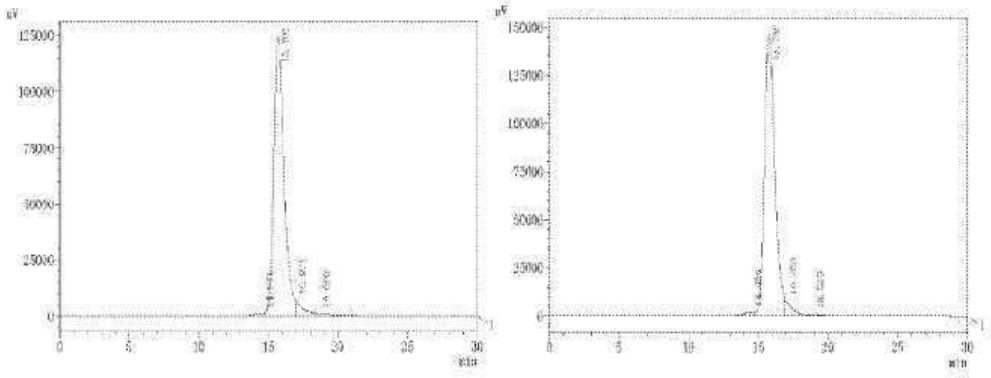
도면1



도면2

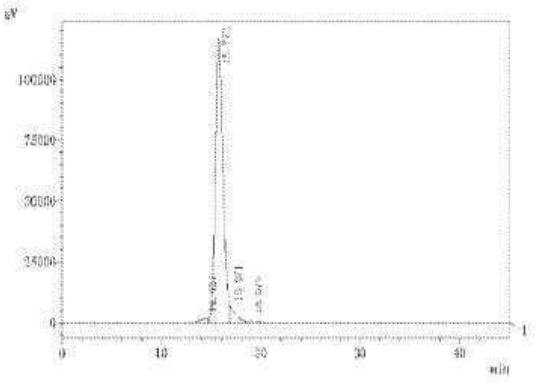


도면3



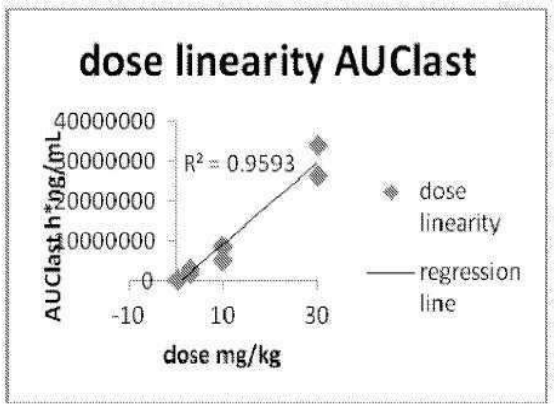
A)

B)

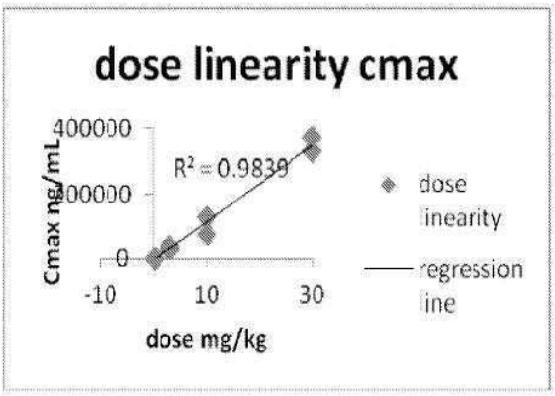


C)

도면4

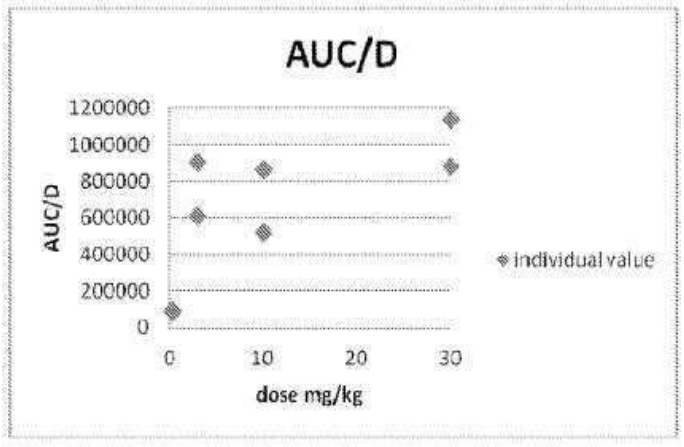

dose linearity AUClast
AUClast h*pg/mL
40000000
30000000
20000000
10000000
0
R² = 0.9593
-10
10
30
dose mg/kg
dose linearity
regression line

A)

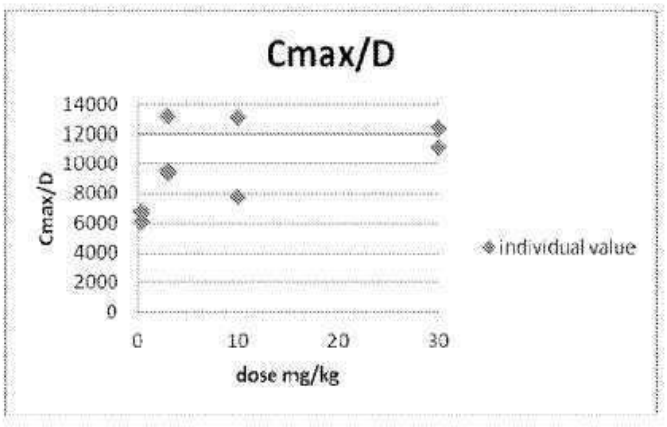

dose linearity cmax
Cmax ng/mL
400000
200000
0
R² = 0.9839
-10
10
30
dose mg/kg
dose linearity
regression line

B)

도면5



A)



B)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> R-Pharm Overseas, Inc.

<120> OSTEOPROTEGERIN DERIVED RANKL INHIBITOR

<130> IPA161416-US

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> hOPG

<222> (1)..(215)

<220><221> hIgG1-Fc

<222> (216)..(442)

<400> 1

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp

20 25 30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
50 55 60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu

85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
100 105 110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
115 120 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys

145 150 155 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
180 185 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
195 200 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

275 280 285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

340 345 350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 2
<211> 1326
<212> DNA
<213> Recombinant

<400> 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 cttccccca 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 cagccccat 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

<210> 3

<211> 8871

<212> DNA

<213> Recombinant

<400> 3

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 cccacccccc 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 cgccccccctg acgagcatca 1080

caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 1140

gtttcccct 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

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

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 gcatttttt 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 cccacccccct 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

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 gcccacccccc 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

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 cagccccat 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