



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201623329 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 01 日

(21) 申請案號：104119828 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 18 日

(51) Int. Cl. : *C07K16/18 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K39/385 (2006.01) *A61P9/10 (2006.01)*
A61P3/10 (2006.01) *G01N33/577 (2006.01)*

(30) 優先權：2014/06/30 歐洲專利局 14175005.9

(71) 申請人：亞佛瑞司股份有限公司 (奧地利) AFFIRIS AG (AT)
 奧地利

(72) 發明人：史戴夫勒 君特 (IT)；蘭林格 克莉絲汀 LANDLINGER, CHRISTINE (AT)；芭
 拉斯 瑪麗 LE BRAS, MARIE (FR)

(74) 代理人：黃耀霆

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：9 共 113 頁

(54) 名稱

針對骨調素截斷變異體的疫苗及單株抗體暨其用途

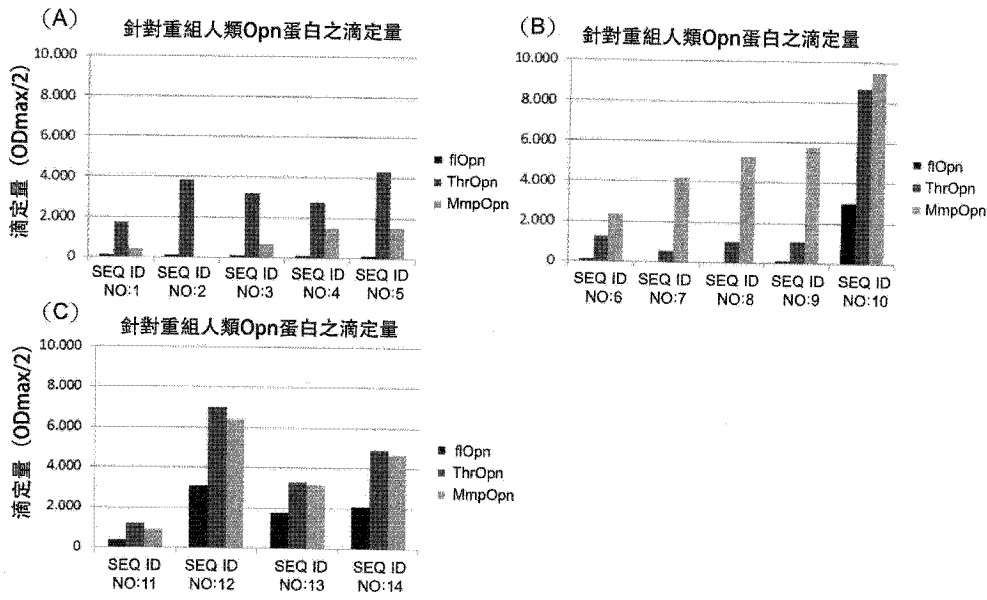
VACCINES AND MONOCLONAL ANTIBODIES TARGETING TRUNCATED VARIANTS OF
 OSTEOPOINTIN AND USES THEREOF

(57) 摘要

本發明提供針對一或多種人類骨調素的截斷變異體具有專一性的單株抗體及疫苗，包含至少一經分離之人類骨調素胜肽，以及製造所述抗體及疫苗的方法。此外，本發明另提供利用所述抗體的診斷方法。所述抗體及疫苗係用於治療方法之應用，特別是治療及/或預防第二型糖尿病及心血管疾病。

The present invention provides monoclonal antibodies specific for one or more truncated variants of human osteopontin and vaccines comprising at least one isolated osteopontin peptide, as well methods for manufacturing said antibodies and vaccines. Furthermore, a diagnostic method making use of said antibodies is provided. Said antibodies and vaccines are used in therapy, especially in treatment and/or prevention of type-2 diabetes and cardiovascular disease.

指定代表圖：



第 1 圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

針對骨調素截斷變異體的疫苗及單株抗體暨其用途 / Vaccines and Monoclonal Antibodies Targeting Truncated Variants of Osteopontin and Uses Thereof

【技術領域】

【0001】 本發明係關於疫苗及單株抗體 (monoclonal antibodies, 簡稱 mAbs), 特別係適用於治療及/或預防第二型糖尿病 (type-2 diabetes, 簡稱 T2D) 及心血管疾病 (cardiovascular disease, 簡稱 CVD) 等慢性發炎疾病。本發明之另一面向, 係關於利用單株抗體之診斷方法。

【先前技術】

【0002】 肥胖症之主要相關疾病的社會及經濟意涵

【0003】 無論就醫療或經濟層面而言, 肥胖症對於現今社會皆是充滿挑戰性的流行病。肥胖症逐漸上升的盛行率, 伴隨心血管代謝疾病 (cardiometabolic) 之風險, 導致肇因於 T2D 及 CVD 的預期壽命降低。舉例而言, 在英國, 近十年之女性過胖率 (身體質量指數 $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) 增加 30%, 男性增加 40%, 而孩童則增加 50%, 導致於 2007 年已有 23% 之成人過胖, 並且預期於 2050 年將增加至 50%。依據疾病管制中心 (Centre for Disease Control, 簡稱 CDC) 之資料, 全世界約有一億五千萬人受到 T2D 之影響 (在美國即有兩千一百萬人), 且預計在未來二十年內將上升至兩億五千萬人。目前, 用於治療 T2D 之費用已超過歐洲國家每年醫療照護預算的 4% 以上, 並且預期上述費用於下一年度將會更急劇上升。造成肥胖症流行之原因仍未完全被了解, 但其所導致之結果已相當明顯, 例如現今大幅上升之 T2D 比率, 甚至發生於孩童及青少年。

【0004】 CVD 係為世界衛生組織歐洲地區（由 53 國所組成）之主要死亡原因，每年超過四百三十萬人死於 CVD。雖然較難計算其發病所導致之醫療負擔，但估計 2006 年歐盟之健康照護體系約花費一千一百億歐元於 CVD。

【0005】 目前針對心血管代謝疾病之風險的預防及治療方法仍不夠完善，需要研究人員（包含學術界及產業界）開發新的健康照護方法，以因應如此重大之生醫挑戰。是以，較不昂貴且服藥順從性（patient compliance）較高的治療及預防方法，就社會及經濟層面皆有重大意義。研究顯示，肥胖症誘發之慢性低度發炎（chronic low-grade inflammation），是影響肥胖症相關胰島素抗性（obesity-relate insulin resistance）及動脈粥狀硬化（astherosclerosis）的常見機制，上述二者則分別會演變成 T2D 及 CVD。因此透過免疫療法（immunotherapy）以降低慢性發炎的關鍵因子，成為針對上述疾病的常見治療方法。

【0006】 發炎作為肥胖症、T2D 及血管疾病之共通機制

【0007】 肥胖症，特別是幹型肥胖（central obesity）是造成胰島素抗性之顯著基礎，續而導致血脂異常（dyslipidemia）及高血壓等代謝症候群（metabolic syndrome）。代謝症候群包含多種變因之組合，共同導致心血管代謝疾病之風險，例如 T2D 及動脈粥狀硬化 CVD 之進程。胰島素抗性之定義，係指對於脂肪組織、肝臟及肌肉等胰島素之主要標的器官，其胰島素敏感度減弱。胰島素調控葡萄糖攝入及循環游離脂肪酸（free fatty acid，簡稱 FFA）的濃度，在脂肪組織中，胰島素刺激葡萄糖攝入及脂肪生成，同時抑制脂肪分解，以降低 FFA 流出；在肝臟中，胰島素透過降低關鍵酵素之活性以抑制糖質新生；而於骨骼肌中，胰島素大幅度地提升葡萄糖攝入。因此，脂肪組織之胰島素抗性將導致循環 FFA 濃度上升及脂肪異常堆積，進而妨礙胰島素於肝臟及骨骼肌之作用。最終，胰島素抗性降

低胰腺 β 細胞之胰島素分泌，而誘發葡萄糖及脂毒性 (gluco- and lipotoxicity)，導致顯著的 T2D。

【0008】 近年來，眾多證據顯示肥胖症係與低度發炎相關，其顯著地導致胰島素抗性之進程。脂肪組織及肝臟係為肥胖症之循環發炎標記 (inflammatory marker) 的主要來源，其導致胰島素敏感性下降。在這些器官中，巨噬細胞可能由於免疫系統中其他細胞之觸發，進而驅動免疫反應，惟其機制尚未完全被了解。研究結果顯示，脂肪組織之巨噬細胞在胰島素抗性的進程中扮演決定性的角色，且上述結果亦受到近期臨床資料的有力支持。

【0009】 胰島素抗性及 T2D 的肥胖症相關狀態之一特徵，係為加速之動脈粥狀硬化，動脈粥狀硬化係為大多數顯著血管疾病 (predominant vascular disease) 的潛在特徵。這樣的關連性具有決定性的意義：大約 80% 的 T2D 患者會死於動脈粥狀硬化 CVD 的併發症，其所增加之死亡風險等同於老化十五歲；而肥胖症則與上升之心肌梗塞相關聯，其所增加之死亡風險等同於老化十歲以上。

【0010】 動脈粥狀硬化曾被認為是脂肪儲存疾病 (lipid-storage disease)，但目前已被視為一種血管壁的發炎狀態，其特徵為巨噬細胞及 T 細胞浸潤，巨噬細胞及 T 細胞會相互作用，並作用於動脈血管壁的細胞。是以，動脈粥狀硬化的病理機制再現了許多於肥胖症中所觀察到的發炎進程之特徵。再且，一份近期的實驗動物研究指出，肥胖症誘發之脂肪組織發炎與加速的動脈粥狀硬化有直接關係，顯示 T2D 與 CVD 有共通的發病原因。

【0011】 基於共通的發炎機制，於動物模型中，近期已有同時針對肥胖症相關之脂肪組織發炎及動脈粥狀硬化等標的之研究。例如，針對脂肪細胞及巨噬細胞脂肪酸結合蛋白 (fatty acid binding protein, 簡稱 aP2) 的

小分子抑制劑，能夠有效地治療 T2D 及動脈粥狀硬化；且研究另指出，於 LDL 受體剔除（knockout）之狀態下，發炎細胞激素 MIF 之缺失能夠降低慢性脂肪組織發炎及胰島素抗性，以及動脈粥狀硬化。相對地，在巨噬細胞中，以基因轉殖法使抑制發炎之脂聯素（adiponectin）及膽固醇酯水解酶（cholesterol ester hydrolase）過量表現，亦具有類似之效果。歸結上述研究，肥胖症的主要併發症，例如胰島素抗性及動脈粥狀硬化，彼此透過慢性發炎互相作用；而同時對於上述併發症進行治療，則是可行且充滿吸引力的方向。（Olefsky JM, Glass CK. *Annu Rev Physiol* 2010;72:219-246, PMID: 20148674; Rocha VZ, Libby P. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:399-409, PMID: 19399028）

【發明內容】

【0012】 綜合上述，本發明之一目的係提供適用於預防及治療之化合物，特別是預防及治療如 T2D 及 CVD 或其相關之特定狀態及／或症狀，例如肥胖相關之胰島素抗性及／或動脈粥狀硬化。

【0013】 本發明之另一目的係提供製造所述化合物之方法，及使用所述化合物的診斷方法。

【0014】 是以，本發明之一面提供一種單株抗體（monoclonal antibody），該單株抗體對於一或多種人類骨調素（osteopontin）的截斷變異體（truncated variant）具有專一性，其中，該單株抗體對於該一或多種截斷變異體的反應性高於其對於全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性；及該單株抗體對於下述具有專一性：(A) 經基質金屬蛋白酶截斷（matrix-metalloproteinase-truncated）之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列），其中該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性高於其對於全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性

及其對於經凝血酶截斷 (thrombin-truncated) 之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列) 的反應性; 或 (B) 經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素及經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列), 其中該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列) 的反應性及其對於經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列) 的反應性皆高於其對於全長之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列) 的反應性; 或 (C) 經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列), 其中該單株抗體係對於一經凝血酶截斷之人類骨調素的抗原表位 (epitope) 具有專一性, 該經凝血酶截斷之人類骨調素的抗原表位具有選自由 VVYGLR、SVVYGLR 及 DSVVYGLR 所組成之群組 (如 SEQ ID NOs: 1~3 所示之序列) 的胺基酸序列, 當該單株抗體對於該胺基酸序列 SVVYGLR (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) 具有專一性時, 該單株抗體之重鏈 (heavy chain, V_H) 的可變域 (variable domain) 及該單株抗體之輕鏈 (light chain, V_L) 的可變域包含下述序列之互補性決定區 (complementarity-determining regions, CDRs): V_H CDR1 GFSLSTYGLG (如 SEQ ID NO: 18 所示之序列)、 V_H CDR2 IYWDDNK (如 SEQ ID NO: 19 所示之序列)、 V_H CDR3 ARGTS PGVSFPY (如 SEQ ID NO: 20 所示之序列)、 V_L CDR1 ENIYSY (如 SEQ ID NO: 21 所示之序列)、 V_L CDR2 NAK (如 SEQ ID NO: 22 所示之序列)、 V_L CDR3 QHHYGTPLT (如 SEQ ID NO: 23 所示之序列), 及該單株抗體對於經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列) 的反應性高於其對於全長之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列) 的反應性及其對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列) 的反應性, 較佳地, 重鏈包含如 SEQ ID NO: 24 所示之序列且輕鏈包含如 SEQ ID NO: 25 所示之序列。

【0015】 本發明之單株抗體特別適用於治療之應用，具體而言，用於治療及／或預防 T2D，特別是肥胖症相關胰島素抗性，及／或用於治療及／或預防 CVD，特別是動脈粥狀硬化，係如下所述。

【0016】 人類骨調素係為一種具有前途的分子標靶

【0017】 人類骨調素 (osteopontin, 簡稱 Opn), 又名分泌磷蛋白-1 (secreted phosphoprotein-1) 或骨涎蛋白-1 (sialoprotein-1), 係由 SPP1 基因所編碼。Opn 係為一種多功能蛋白, 表現於活化之巨噬細胞及 T 細胞、蝕骨細胞、肝細胞、平滑肌、外皮細胞及上皮細胞, 且屬於發炎細胞激素的一種。Opn 參與細胞遷移, 特別是單核球 (monocyte) / 巨噬細胞之細胞遷移。於單核球黏附 (adhesion) 至內皮組織的過程中, Opn 主要是作用於單核球, 而內皮細胞的主要附著機制則不受 Opn 調控。此外, Opn 可以誘發其他多種發炎細胞激素及趨化激素 (chemokine) 的表現, 以及表現基質金屬蛋白酶 (matrix metalloprotease, 簡稱 MMP) 之表現, 以誘發基質降解及促進細胞移動性 (cell motility)。Opn 的這些功能係源於其結合至整聯蛋白 (integrin) 及 CD44 等附著分子 (adhesion molecule) 的能力, 其機制詳如後述。對於受到損傷及發炎之組織的趨化反應 (chemotaxis) 及侵入反應 (invasion), 免疫細胞的功能是必須的, 且免疫細胞係透過附著以整合其功能。除了附著以外, 整聯蛋白及 CD44 透過轉換訊息, 導致免疫細胞之遷移、生長、存活、分化及活化發炎反應與適應性免疫反應。

【0018】 如後續段落所描述, Opn 係為一種治療肥胖症相關疾病的標靶分子, 所述之肥胖相關疾病係基於代謝組織及血管壁的慢性低度發炎, 且造成心血管代謝疾病之風險。多株抗體 (polyclonal antibodies) 已被成功應用於被動免疫療法, 以阻斷 (block) Opn 之功能及治療發炎失調疾病, 包含肥胖症引發之胰島素抗性 (Kiefer FW, et al. Diabetes 2010;59:935-946; PMID: 20107108)。

【0019】 Yan 等人 (Yan, Xiaoxiang, et al.; *Cardiovasc Diabetol* 9.1 (2010): 70-78.) 的研究揭露在第二型糖尿病患者中，腎臟及冠狀動脈疾病的發生及嚴重程度係與血漿中骨調素的濃度相關，而非與經凝血酶切割之骨調素相關。

【0020】 Opn 在肥胖症相關胰島素抗性及動脈硬化中所扮演的角色

【0021】 在人類與不同的鼠科動物中，Opn 會受到肥胖症的高度正向調控 (Gomez-Ambrosi J et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3719-3727. PMID: 17595250. Kiefer FW et al. *Endocrinology* 2008;149:1350-1357. PMID: 18048491)。數篇近期的研究指出，Opn 係作為肇因參與肥胖症引發之脂肪組織發炎及胰島素抗性，並與肝臟皮脂腺病 (liver steatosis) 有密切的關聯 (例如 Kiefer FW, et al. *Diabetes* 2010;59:935-946; PMID: 20107108)。令人驚訝地，於小鼠中的被動免疫反應顯示，對於活體施打抗體以中和 Opn，可以顯著地提升胰島素訊息傳遞，進而藉由降低肥胖症相關之脂肪組織發炎及肝臟發炎，而減緩胰島素抗性。

【0022】 這些結果顯示，在肥胖症引發之脂肪組織發炎反應中，巨噬細胞活化係為 Opn 在脂肪組織中作用的一種機制。

【0023】 Opn 不僅僅於肥大的脂肪組織內過量表現，於動脈粥狀硬化斑塊 (plaque) 及主動脈瓣膜損傷 (aortic valvular lesion) 中，Opn 也在巨噬細胞、平滑肌及內皮細胞內大量存在。在心臟瓣膜疾病 (vascular disease) 的病患中，血漿中的 Opn 係為一種診斷指標，並與類風濕關節炎 (rheumatoid arthritis) 病患中的動脈硬化 (arterial stiffness) 相關。剔除實驗顯示 Opn 直接參與血管收縮素-II (angiotensin-II) 所引發之動脈粥狀硬化及動脈瘤 (aneurysm) 形成 (Bruemmer D et al. *J Clin Invest* 2003;112:1318-1331. PMID: 14597759)。具有脂蛋白 E (apolipoprotein E, 簡稱 ApoE) 及 Opn 基因同時缺失的母鼠，餵食普通飼料，可以顯著防止

動脈粥狀硬化。再且，ApoE、LDL 受體 (LDL receptor, 簡稱 LDLR) 及 Opn 皆呈陰性的母鼠，相較於剔除 ApoE 及 LDLR 者，其損傷情形較輕微，且中央增厚 (medial thickening) 之情形也較低。反之亦然，於餵食高脂肪及高膽固醇飼料之 C57BL/6 小鼠中，以遺傳工程方法使 Opn 過量表現，將導致動脈粥狀硬化損傷的加速生成，中央增厚情形上升，以及血管內膜增生 (neointimal formation)。此外，Opn 亦與 T2D 相關之血管疾病有關聯，其意涵係為糖尿病患之大血管及微血管疾病 (macro- and microvascular diseases)，以及在鏈佐黴素 (streptozotocin) 引發之缺乏 Opn 的糖尿病小鼠中，仍維持之心臟功能，例如記載於 Subramanian V 等人所發表之期刊論文 (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;292:H673-683. PMID: 16980342)。

【0024】 Opn 在其他疾病中所扮演的角色

【0025】 Opn 亦參與全身性發炎 (systemic inflammatory) 或自體免疫疾病 (autoimmune disease) 的致病機轉中，除了於上述所提及的失調中所扮演的角色，Opn 另於類風濕關節炎、心臟纖維化 (cardiac fibrosis)、多發性硬化症 (multiple sclerosis) 之中扮演重要角色，並影響實驗性自體免疫性腦脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis) 的進程。此外，Opn 亦在許多惡性腫瘤中過量表現，例如乳癌及攝護腺癌、骨肉瘤 (osteosarcoma)、膠質母細胞瘤 (glioblastom)、鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma) 及黑色素瘤 (melanoma)，並在促進腫瘤生長及決定其轉移潛力 (metastatic potential) 中扮演決定性的角色。

【0026】 Opn 的結構及功能

【0027】 Opn 帶有高負電荷，且係為細胞外基質蛋白 (extracellular matrix protein)，約由 314 個胺基酸 (人類，小鼠則為 297 個胺基酸) 所組成，並可以被表達為 33 kDa 的新生蛋白 (nascent protein)。預測骨調素的

二級結構，係由八個 α -螺旋及六個 β -薄板片段所組成，轉譯後修飾可以產生針對細胞類型及狀態之特定變異體，並可能是已知的分子量差異之原因。

【0028】 整聯蛋白及 CD44 之結合功能域

【0029】 Opn 能夠透過結合及接合整聯蛋白，以調控許多細胞活性。位於中央的 159RGD161 序列與大量表現於巨噬細胞及蝕骨細胞中的 $\alpha v\beta 3$ 整聯蛋白，兩者之間的交互作用已記載於許多文獻中。在該 RGD 區域中並未存在相應的磷酸化位置，而鄰近該 RGD 序列，經由凝血酶切割而暴露的隱蔽整聯蛋白結合位 (cryptic integrin-binding site) 162SVVYGLR168 (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) 可以被白血球所表現之 $\alpha 4\beta 1$ 及 $\alpha 9\beta 1$ 整聯蛋白所辨識。此外，金屬蛋白酶 MMP3、MMP7 及 MMP9 會切割 Opn，造成該隱蔽整聯蛋白結合位的一個輕微截斷型態 162SVVYG166，其仍可以被白血球所表現之 $\alpha 4\beta 1$ 及 $\alpha 9\beta 1$ 整聯蛋白所辨識。

【0030】 CD44 已被認定為 Opn 的一種受體，以控制巨噬細胞的趨化激素及細胞激素之反應。然而，其他研究及一份未公開實驗則反對並質疑 CD44 為 Opn 的一種附著受體 (adhesive receptor)。

【0031】 蛋白水解產物 (proteolytic product)

【0032】 Opn 具有數個具功能重要性的切割位置，全長的 Opn 可以經由凝血酶切割以暴露該該隱蔽整聯蛋白結合序列 162SVVYGLR168 (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列)。該隱蔽區域的小鼠同源序列 (SLAYGLR, 如 SEQ ID NO: 46 所示之序列)，被認為在實驗性關節炎 (experimental arthritis) 的進程中是必要的 (Yamamoto N, et al. J Clin Invest 2003;112:181-188. PMID: 12865407)。目前幾乎沒有關於 Opn 切割之調控的資料，然而，經凝血酶切割之 Opn 大量存在於風濕病患的關節液中，以及類風溼關節炎病患的尿液中。Sharif 等人 (Sharif, Shadi A., et al. "Thrombin-activatable carboxypeptidase B cleavage of osteopontin regulates

neutrophil survival and synoviocyte binding in rheumatoid arthritis." *Arthritis & Rheumatism* 60.10 (2009): 2902-2912.) 提及在類風濕關節炎中，經凝血酶切割之 Opn (該期刊論文中簡稱「OPN-R」，本發明中則簡稱為「ThrOpn」)，以及 OPN-R 經由可被凝血酶活化之羧基胜肽酶 B (thrombin-activatable carboxypeptidase B, 簡稱 CPB) 加工而產生 OPN-L。爲了研究 OPN-R 及 OPN-L 在類風濕關節炎中的重要性，而發展出了特別針對這些經切割之 Opn 的 ELISA (該期刊論文之第 2903 頁第 2 欄第 2 節)。簡略言之，係先製作針對結合 KLH 之 Opn 胜肽 (KLH-conjugated Opn peptides) 的兔多株抗體，即，SVVYGL 的兔多株抗體 (該期刊論文之第 2903 頁第 2 欄第 2 節)，續對其抗原表位 (epitope) 進行分析 (該期刊論文之第 2904 頁第 1 欄第 2 節，及第 1 圖)，而後藉由免疫吸附反應以純化，去除交叉反應 (cross-reactive) 之抗體 (該期刊論文之第 2905 頁第 1 欄第 1 節)。這些經純化之多株抗體係用於測量在骨性關節炎 (osteoarthritis)、牛皮癬性關節炎 (psoriatic arthritis) 及類風濕關節炎病患的關節液中 OPN-R (ThOpn)、OPN-L 及 OPN 的濃度 (該期刊論文第 2 圖)，並用於針對關節滑膜之檢體進行免疫染色反應。該期刊論文僅發表抗 Opn 抗體作爲類風濕關節炎之研究工具的用途，而未提及抗 Opn 抗體或抗 Opn 疫苗用於治療之用途。

【0033】 一份近期的人體研究中，組織萃取物的酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 簡稱 ELISA) 顯示，凝血酶以及經凝血酶切割之 Opn 的表現量，在狹窄被動脈瓣的鈣化區 (calcified region) 較高，而在非鈣化區較低。

【0034】 同時，Opn 也是基質金屬蛋白酶 MMP-3、MMP-7、MMP-2 及 MMP-9 的作用受質。值得注意地，十一種 MMP 的蛋白酶活性上升可能導致動脈粥狀硬化生成，且在小鼠與人類的肥胖症中，包含 MMP-7 與

MMP-9 等數種 MMP 的表現量皆上升(Unal R, et al. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:2993-3001. PMID: 20392866)。這些 MMP 中，有多種是經由巨噬細胞分泌產生，或表現於巨噬細胞之表面，而 MMP-9 的活性甚至是經由 Opn 所誘發。另請注意，MMP-9、MMP-7 及 MMP3 的切割位置 166GL167 直接位於凝血酶切割位置 168RS169 的旁邊。因此，MMP 可以如同凝血酶般進行切割，以暴露該隱蔽整聯蛋白結合位。一份研究指出，MMP-3 及 MMP-7 的切割可以促進 Opn 的功能，以分別作為小鼠腫瘤細胞及巨噬細胞的附著及遷移刺激。再且，透過重組胜肽之功能分析，該 162SVVYG166 區域極可能可以有效地調控與 β 1 整聯蛋白之結合。

【0035】 用於中和 Opn 功能之抗原表位

【0036】 除了成功地將抗 Opn 之多株抗體用於治療肥胖症相關發炎反應及胰島素抗性，以及例如腎小球纖維化 (glomerular fibrosis) 之外，數種 mAbs 已被用於被動免疫反應研究中，並成功阻斷 Opn 之功能：

【0037】 抗 SLAYGLR (如 SEQ ID NO: 46 所示之序列，為人類如 SEQ ID NO: 2 所示之 162SVVYGLR168 序列的同源序列) 之抗體 M5 在關節炎小鼠的關節中，會破壞單核球之遷移，抑制關節滑膜增生、骨侵蝕 (bone erosion) 及發炎細胞浸潤 (Yamamoto N, et al. J Clin Invest 2003;112:181-188. PMID: 12865407)。抗 SVVYGLR 的嵌合 mAb (C2K1, 如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) 已於非人類之靈長類的類風濕關節炎模型中成功完成試驗 (Yamamoto N, et al. Int Immunopharmacol 2007;7:1460-1470. PMID: 17761350)。

【0038】 mAb53 透過一個抗原表位抑制 RGD 依賴性細胞附著至 Opn，且該抗原表位僅於凝血酶切割前顯現 (Bautista DS, et al. J Biol Chem 1994;269:23280-23285. PMID: 8083234)。另一 mAb (Opn 1.2) 藉由結合至 Asp113-Arg128 以抑制 RGD 之功能，並進而引發分子內的變化 (Yamaguchi

Y, Hanashima S, Yagi H, et al. NMR characterization of intramolecular interaction of osteopontin, an intrinsically disordered protein with cryptic integrin-binding motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393:487-491. PMID: 20152802)。

【0039】 這些抗體在活體中的應用從來不曾被揭露。

【0040】 抗212NAPSD216的一種人類化 mAb 已顯示能夠在人類乳癌細胞株中，有效抑制細胞附著、遷移、侵入及群落形成 (colony formation)，並且在人類乳癌之小鼠肺轉移模型中，能夠顯著抑制原發腫瘤 (primary tumor) 之生長及自發性轉移 (Dai J, et al. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:355-366. PMID: 19690854)。

【0041】 對於 Opn 的 N 端之 41ATWLNPDPSPKQ52 模體 (motif) 具有專一性之 mAb 23C3，可以在膠原蛋白誘發之關節炎中，降低發炎細胞激素的生產及促進活化 T 細胞的凋亡 (Fan K, et al. *Arthritis Rheum* 2008;58:2041-2052. PMID: 18576331)。另一 mAb (F8E11) 之標的則為另一個 N 端序列 31QLYNKYP37，在體外實驗中，可以阻斷 Opn 所引發之細胞活化及遷移 (Dai J, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:715-720. PMID: 19285028)。

【0042】 從上述研究結果可以歸納出這樣的結論：針對微小但具有功能重要性的 Opn 抗原表位，mAb 造成的被動免疫反應可以有效地干擾慢性發炎反應。

【0043】 再且，下列文獻中提及抗 Opn 之 mAbs：

【0044】 Kon 等人 (Kon, Shigeyuki, et al., "Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences." *Journal of Cellular Biochemistry* 84.2 (2002): 420-432.) 揭露以數個與甲狀腺球蛋白 (thyroglobulin) 偶合之 Opn 胜肽 (請見該期

刊論文第 1 圖)免疫小鼠，以自脾細胞之雜交瘤(hybridomas of splenocytes)中取得五個 mAbs (第 423 頁第 1 欄)。這些 mAbs 係用於分析健康男性的尿液(該期刊論文第 3 圖)以及腫瘤細胞株之上清液(該期刊論文第 4 圖)之中，所選定之 Opn 抗原表位。該期刊論文僅發表以抗 Opn 之 mAb 作為 Opn 相關之生理學及病理學進程的研究工具(請見該期刊論文「討論」段落之最後三行)，惟未提及任何抗 Opn 之 mAb 的醫療用途或抗 Opn 之疫苗。

【0045】 用以對抗 Opn 之疫苗的安全考量

【0046】 Opn (Spp1) 剔除之顯性特徵

【0047】 對於被認為具有心血管代謝疾病之風險但尚未急性發作之病患，安全係為一重要議題。值得注意的是，兩個獨立的 Spp1 缺失小鼠品系的同型合子，是能夠存活及繁殖的，其體型正常，且未顯示任何生理或行為之異常。(Liaw L, et al. J Clin Invest 1998;101:1468-1478. PMID: 9525990. Rittling SR et al. Journal of Bone and Mineral Research 1998;13:1101-1111. PMID: 9661074)

【0048】 Opn 作為免疫療法標靶之結論

【0049】 T2D 及 CVD 具有共通的發炎反應基礎，且 Opn 係為一關鍵分子，無論在活體中或體外，Opn 之功能涉及胰島素抗性及動脈粥狀硬化之生成。因此，就效能及安全性而言，皆能夠合理考量以 Opn 作為免疫療法之標的。

【0050】 在人類歷史中，其中一種最有效的醫療照護方法即為疫苗之使用。在上一個世紀中，針對傳染性疾病的預防性疫苗佔有顯著地位；而近年來，越來越多的注意力已轉移至治療性疫苗的開發，包含主動及被動疫苗。數種抗體已被作為臨床用藥，以鎖定發炎反應及瘤生成疾病(neoplastic disease)之關鍵分子，且能夠提供非常好的專一性及效果。除了上述的被動免疫療法之研究成果外，主動疫苗之研究亦顯示其效用：在

數個動物研究及第一階段臨床試驗（first clinical trial）之中，治療性 B 細胞疫苗能夠治療多種非傳染性之人類疾病，有潛力成為較易負擔且較有效之治療選項。因此，主動治療性疫苗之概念，係為一種免疫療法之策略，可以適用於幾乎所有被動免疫療法能夠成功之疾病。其原則係為設計一種引發免疫反應的疫苗，以對抗一給定疾病中，具有致病性且會過量表現的一內源性蛋白（endogenous protein）。目前大多數可用之治療性疫苗，係使用自身蛋白（self-protein）或以此類蛋白所衍生之自身抗原表位（self-epitope），或者該抗原表位的一種修飾型態（通常係指模擬表位，mimotope）與一載劑結合，上述兩者皆經過處理，以誘發針對該標的蛋白之強烈的體液免疫反應，進而中和該標的蛋白的致病活性。

【0051】 數個不同的 Opn 抗原表位，包含受體結合位、蛋白水解切割所導致之推定的新抗原表位（putative neoepitope）及結合後會導致功能性構型變化之抗原表位，皆可以作為對抗 Opn 之免疫療法策略的標的序列：

【0052】 在本發明的研究課題之中，測量了許多 Opn 之抗原表位（所有表列於第 2 表之抗原表位）的致免疫力（immunogenicity），並測量其所產生之血清／抗體對於特定 Opn 截斷變異體的選擇性，以及該血清／抗體之功能（第 1～5 圖）。結果顯示，存在數個抗原表位，其可以產生對於一或多種人類骨調素（Opn）的截斷變異體具有專一性的 mAb。並且，令人驚訝地，所述抗體實質上對於一或多種截斷變異體的反應性（及專一性）高於其對於全長之 Opn（full-length Opn，簡稱 flOpn）的反應性（及專一性）。（例如第 3 圖所示）

【0053】 因此，本發明之一面向提供一種 mAb，其對於一或多種人類骨調素（osteopontin，簡稱 Opn）的截斷變異體（truncated variant）具有專一性，該 mAb 對於該一或多種截斷變異體的反應性高於其對於全長之 Opn（full-length Opn，簡稱 flOpn）的反應性。

【0054】 該抗體係對於下述具有專一性：(A) 經基質金屬蛋白酶截斷之 Opn (matrix-metalloproteinase-truncated Opn, 簡稱 MmpOpn, 具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列), 其中該抗體對於 MmpOpn 的反應性高於其對於 flOpn (具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列) 的反應性及其對於經凝血酶截斷之人類骨調素 (thrombin-truncated Opn, 簡稱 ThrOpn, 具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列) 的反應性; 或 (B) MmpOpn 及 ThrOpn, 其中該抗體對於 MmpOpn 的反應性及其對於 ThrOpn 的反應性皆高於其對於 flOpn 的反應性; 或 (C) ThrOpn, 其中該抗體係對於一 ThrOpn 的抗原表位具有專一性, 該 ThrOpn 的抗原表位之胺基酸序列係選自由 VVYGLR、SVVYGLR 及 DSVVYGLR 所組成之群組 (如 SEQ ID NOs: 1~3 所示之序列), 當該抗體對於該胺基酸序列 SVVYGLR 具有專一性時, 該抗體之重鏈 (heavy chain, 簡稱 V_H) 的可變域及該抗體之輕鏈 (light chain, 簡稱 V_L) 的可變域包含下述序列之互補性決定區 (complementarity-determining regions, 簡稱 CDRs) (例如, 本發明之課題所生產的 mAb 4-4-2 之 CDRs, 如第 3 表所示): V_H CDR1 GFSLSTYGLG (如 SEQ ID NO: 18 所示之序列)、V_H CDR2 IYWDDNK (如 SEQ ID NO: 19 所示之序列)、V_H CDR3 ARGTSPGVSPFY (如 SEQ ID NO: 20 所示之序列)、V_L CDR1 ENIYSY (如 SEQ ID NO: 21 所示之序列)、V_L CDR2 NAK (如 SEQ ID NO: 22 所示之序列)、V_L CDR3 QHHYGTPLT (如 SEQ ID NO: 23 所示之序列), 及該抗體對於 ThrOpn 的反應性高於其對於 flOpn 的反應性及其對於 MmpOpn 的反應性, 較佳地, V_H 包含或具有如 SEQ ID NO: 24 所示之序列, 且 V_L 包含或具有如 SEQ ID NO: 25 所示之序列。該抗體之較佳同型 (isotype) 係為免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, 簡稱 IgG), 且較佳之輕鏈類型係為 kappa 型。

【0055】 CDRs 代表抗體之可變區域 (variable region), 抗體係藉由

CDR 結合至其專一之抗原表位。重鏈的類型及數目決定了抗體的分類，例如分別為 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM 抗體。抗體另包含兩個相同之輕鏈，其可以為 lambda 或 kappa 型。

【0056】 對於 Opn 的截斷變異體 (MmpOpn、ThrOpn，或二者皆是) 具有專一性，同時對於全長之蛋白 (flOpn) 的反應性較低，而能夠很準確地運用於治療中。對於使用本發明之該抗體進行治療之病患，上述特性可以降低副作用之發生。本發明之抗體係經過仔細挑選，以展現這樣有益的專一性 (請參照實施方式)。

【0057】 請參見第 2 表，其為本發明之課題中所研究的抗原表位。

【0058】 對於包含 SVVYGLR 的一胜肽 (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) 具有專一性的一抗體，已記載於例如 PCT 公開第 2009/023411 A1 號、美國公開第 2007/0274993 A1 號、第 2006/0002923 A1 號及第 2004/0234524 A1 號等專利案中。然而，上述專利案皆未提及本案「提供對於 SVVYGLR (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) 具有專一性之一 mAb，其中該 mAb 對於 ThrOpn 之反應性高於 flOpn 及 MmpOpn」技術特徵。此外，上述專利案完全未提及對於 MmpOpn 或同時對於 MmpOpn 及 ThrOpn 具有專一性之抗體。

【0059】 另有其他已知抗 Opn 的單株抗體，然而，這些抗體並不具有本發明之抗體於此所述的有益特性 (具體而言，對於 MmpOpn 或 ThrOpn 或二者皆有較強的反應性，而對於 flOpn 反應性較弱)：

【0060】 2K1、C2K1 (Yamamoto N, et al. Int Immunopharmacol 2007;7:1460-1470. PMID: 17761350)：小鼠的 mAb 2K1 選殖株 (clone) 係抗人類 Opn 胜肽 VDTYDGRGDSVVYGLRS (如 SEQ ID NO: 48 所示之序列)，在體外實驗中，2K1 選殖株可以抑制 RGD 依賴性細胞附著至全長之 Opn，以及抑制 RGD 依賴性細胞附著至重組之 N 端 Opn (等同於 ThrOpn，第 1~168 個胺基酸)。此外，2K1 可以抑制與全長、經凝血酶切割及重組

之 N 端 Opn 相關之 $\alpha 9$ 調控之細胞遷移。因此，2K1 選殖株可以辨識人類 Opn 的隱蔽抗原表位 SVVYGLR (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列)。較晚發展之 mAb C2K1 是一種嵌合抗體，係以 2K1 的可變區域與人類 IgG1 的不變區域 (constant region) 融合而得。在體外實驗中，C2K1 分別能夠抑制分別與人類及猴子的 N 端 Opn 有關之人類及猴子的單核球遷移。於活體的治療研究中，C2K1 可以在非人類靈長類之中改善膠原蛋白誘發的關節炎。2K1 及 C2K1 可以辨識 Opn 的隱蔽抗原表位且具有功能性，但 2K1 及 C2K1 無法有差異地辨識 flOpn 及 ThrOpn，且 2K1 及 C2K1 針對 MmpOpn 的反應性及功能尚未被揭露。

【0061】 mAb53、mAb87-B (Bautista DS, et al. J Biol Chem 1994;269:23280-23285. PMID: 8083234): mAb53 及 mAb87-B 皆係對抗一細菌製造之重組 GST-人類 Opn (GST-human Opn, 簡稱 GST-hOpn) 所產生。由於上述抗體係對抗全長蛋白，故不具有本發明之抗體的有益特性。

【0062】 34E3: 抗人類 Opn 胜肽 CSVVYGLR (如 SEQ ID NO: 49 所示之序列) 的小鼠 mAb 選殖株 34E3, 能夠專一性地辨識 C 端胺基酸序列 YGLR (如 SEQ ID NO: 50 所示之序列)。34E3 會與經凝血酶切割之小鼠 Opn、兔子 Opn 及人類 Opn 交叉反應，但不會與未經切割之 Opn 反應。34E3 能夠抑制惡性腫瘤細胞株 B16.F10 與小鼠 Opn 胜肽 VDVPNGRGDSLAYGLR (如 SEQ ID NO: 47 所示之序列) 及 SLAYGLR (如 SEQ ID NO: 46 所示之序列) 相關之附著，但對於與 GRGDS 相關之附著則不具抑制效果，顯示 34E3 之附著抑制效果僅對於 $\alpha 4$ 整聯蛋白及 $\alpha 9$ 整聯蛋白具有專一性。關於其對於人類 Opn 序列的功能，則未有任何實驗資料，亦未提及抗 MmpOpn 的反應性及功能 (請見美國公開第 2011/312000 A1 號專利案)。

【0063】 於本發明另一較佳實施例中，該抗體係對於一 MmpOpn 的

抗原表位具有專一性，該 MmpOpn 的抗原表位具有選自由 GDSVVYG、RGDSVVYG 及 DGRGDSVVYG (如 SEQ ID NOs: 7~9 所示之序列) 所組成之群組的胜肽序列，或者，該抗體係對於一 MmpOpn/ThrOpn 的抗原表位具有專一性，該 MmpOpn/ThrOpn 的抗原表位具有選自由 TYDGRGDSVVYG (如 SEQ ID NO: 10 所示之序列) 及 PTVDTYDGRGDS (如 SEQ ID NO: 14 所示之序列) 所組成之群組的胜肽序列。

【0064】 該血清以最適合本發明之該抗原表位產生，並對該血清之生物活性進行分析 (如第 2 圖所示)。以三個特別合適之抗原表位產生選擇性之 mAbs (其特徵如第 3~5 圖所示，另請參照第 3 表及實施方式)。因此，本發明之另一實施例揭露特別合適之抗體，更具體而言，本發明揭露這些抗體的 CDR 序列或 V_H 或 V_L 序列 (本發明對於 SVVYGLR (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) 具有專一性之抗體的序列已揭露如上述)：

【0065】 這些較佳實施例的其中之一，係為對於胜肽序列為 GDSVVYG 之抗原表位具有專一性之該抗體，且該抗體的 CDRs 包含下列序列 (即，本發明之課題所產生的 mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 之 CDRs，如第 3 表所示；mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 顯示為實質上相同)： V_H CDR1 GITFNTNG (如 SEQ ID NO: 26 所示之序列)、 V_H CDR2 VRSKDYNFAT (如 SEQ ID NO: 27 所示之序列)、 V_H CDR3 VRPDYYGSSFAY (如 SEQ ID NO: 28 所示之序列)、 V_L CDR1 QSIVHSNGNTY (如 SEQ ID NO: 29 所示之序列)、 V_L CDR2 KVS (如 SEQ ID NO: 30 所示之序列)、 V_L CDR3 FQGSHPWT (如 SEQ ID NO: 31 所示之序列)，及較佳地， V_H 包含或具有如 SEQ ID NO: 32 所示之序列且 V_L 包含或具有如 SEQ ID NO: 33 所示之序列。該抗體之較佳同型係為 IGg，且較佳之輕鏈類型係為 kappa 型。

【0066】 這些較佳實施例的其中另一者，係為對於胜肽序列為

TYDGRGDSVVYVG 之抗原表位具有專一性之該抗體，且該抗體的 CDRs 包含下列序列（即，本發明之課題所產生的 mAb 21-5-4 之 CDRs，如第 3 表所示）： V_H CDR1 GFSLSTSGLG（如 SEQ ID NO：34 所示之序列）、 V_H CDR2 ISWDDSK（如 SEQ ID NO：35 所示之序列）、 V_H CDR3 ARSGGGDSD（如 SEQ ID NO：363 所示之序列）、 V_L CDR1 SSVNS（如 SEQ ID NO：37 所示之序列）、 V_L CDR2 DTS（如 SEQ ID NO：38 所示之序列）、 V_L CDR3 FQGSGYPLT（如 SEQ ID NO：39 所示之序列），及較佳地，該 V_H 包含或具有如 SEQ ID NO：40 所示之序列且該 V_L 包含如 SEQ ID NO：41 所示之序列。該抗體之較佳同型係為 IGg，且較佳之輕鏈類型係為 kappa 型。

【0067】 儘管在 CDR 中的突變可能導致親和力或選擇性之降低，惟，於一限定數量內之突變仍是可容忍的，甚或可以對於親和力或選擇性有所助益。因此，於本發明另一較佳實施例中，本發明之抗體的 V_H 、 V_L 或 CDR 之中的三個胺基酸突變為其他胺基酸；較佳地，本發明之抗體的 V_H 、 V_L 或 CDR 之中的二個胺基酸突變為其他胺基酸；更佳地，本發明之抗體的 V_H 、 V_L 或 CDR 之中的一個胺基酸突變為其他胺基酸。

【0068】 若本發明之抗體具有較低的交叉反應性，則特別具有益處。因此，本發明另一較佳實施例提供本發明之抗體，其中，當該抗體對於 MmpOpn 具有專一性時，該抗體對於 MmpOpn 的反應性係為其對於 flOpn 的反應性及其對於 ThrOpn 的反應性的 N 倍以上；及當該抗體對於 MmpOpn 及 ThrOpn 具有專一性時，該抗體對於 MmpOpn 的反應性及其對於 ThrOpn 的反應性係為其對於 flOpn 的反應性的 N 倍以上；及當該抗體對於 ThrOpn 具有專一性時，該單株抗體對於 ThrOpn 的反應性係為其對於 flOpn 的反應性及其對於 MmpOpn 的反應性的 N 倍以上；及 N 係大於 1.5，較佳係大於 2，更佳係大於 3，再更佳係大於 5，最佳係大於 10。

【0069】 於本發明所屬技術領域中，ELISA 係常用於檢測抗體（或血清）的（交叉）反應性。因此，較佳地，該抗體對於 MmpOpn、ThrOpn 及 flOpn 的反應性係分別於塗覆有 MmpOpn、ThrOpn 及 flOpn 的一薄板上，以 1%BSA 阻斷之後，透過 ELISA 測定，且包含下述條件：抗體濃度：0.25 $\mu\text{g/ml}$ ，二級、結合 HRP 之抗體濃度：0.1 $\mu\text{g/ml}$ ，HRP 受質：ABTS 及 0.1% 過氧化氫，讀取：405 nm 之吸光值。

【0070】 係能夠以抗體對於特定抗原表位（或配體，ligand）之解離常數（dissociation constant，簡稱 K_d ，又稱為「親和力」），以及抗體對於特定抗原表位（或配體）之解離速率值（off-rate value），對抗體進行分類，上述之解離常數及解離速率值（及其測量方法）皆係為本發明所屬技術領域之通常知識。若不考慮其他參數，該抗體之親和力越高（即， K_d 越低）及／或解離速率值越低，則顯示該抗體有更佳之適用性。

【0071】 因此，於本發明另一較佳實施例中，該抗體對於其對應之抗原表位及／或其對應之 Opn 蛋白的解離常數 K_d 係低於 50 nM，較佳低於 20 nM，更佳低於 10 nM，再更佳低於 5 nM，最佳低於 2 nM。此外，於本發明另一較佳實施例中，該抗體對於其對應之抗原表位及／或其對應之 Opn 蛋白的解離速率值係低於 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ ，較佳低於 $3 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ ，更佳低於 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ ，再更佳低於 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 。測量本發明選定之抗體的解離常數及解離速率值，其結果係如第 4 表所示。

【0072】 本發明之抗體較佳係為人類化抗體，而獲取人類化抗體之方法係為本發明所屬技術領域之通常知識。其中一種方法，係將前述之可變區域插入一人類抗體之架構（scaffold）中（例如，請見 Hou S, et al., *J Biochem* 2008, PMID: 18424812）。

【0073】 「人類化抗體」係指一嵌合抗體，包含來自非人類 HVRs 之胺基酸殘基及來自人類固定區域（fixed regions，簡稱 Frs）之胺基酸殘基。

「骨架(framework, 簡稱 FR)」係指除了高度變異區域(hypervariable region) 殘基以外的可變域殘基。一個可變域的 FR 通常由四個 FR 域所組成: FR1、FR2、FR3 及 FR4。是以, 在 V_H (或 V_L) 的 HVR 及 FR 序列通常為: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。在某些實施例中, 一個人類化抗體大致上會包含至少一可變域之全部, 較典型係包含二個可變域之全部, 該可變域中全部或大致上全部的 HVRs (例如, CDRs) 係對應一非人類抗體的 HVRs, 且全部或大致上全部的 FRs 對應一人類抗體的 FRs。一人類化抗體可選擇包含衍生自人類抗體的一抗體不變區域的至少一部份。於一較佳實施例中, 係將小鼠的 HVR 嫁接入一人類抗體的骨架區域, 以製備該人類化抗體。小鼠可變區域的氨基酸序列係與人類生殖系 (germline) 抗體 V 基因之一選群匹配, 並依據序列相似度 (sequence identity) 及同源性 (homology) 分類。受體序列之選擇, 係考量總體序列同源性較高者, 並且, 可以選擇參考受體序列中已存在之正確的規範殘基 (canonical residue)。該生殖系 V 基因僅編碼用以形成重鏈之 HVR3 的起始部分, 至輕鏈的 HVR3 之中段。因此, 生殖系 V 基因的基因序列並未與整個 V 結構域相匹配。該人類化構築體 (humanized construct) 分別包含該人類骨架 1~3、該小鼠 HVRs 及衍生自人類 JK4 之人類骨架 4 序列, 以及用以形成輕鏈及重鏈之 JH4 序列。於挑選一個特定的受體序列之前, 可以先決定捐助者抗體 (donor antibody) 中所謂的規範環形結構 (canonical loop structure), 這些規範環形結構是由出現在所謂的固定位置 (canonical position) 之殘基類型所決定。這些位置 (一部分) 位於 HVR 區域之外, 且在最終構築體中應維持其功能相等, 以維持母源 (捐助者) 抗體 (parental antibody) 的 HVR 之構形。PCT 公開第 2004/006955 A1 號專利案揭露一種將抗體人類化的方法, 包含辨識非人類成熟抗體之 HVRs 的固定 HVR 結構類型 (canonical HVR structure type); 獲取一人類抗體可變區域的胜肽序列資料庫; 決定該

資料庫中可變區域的固定 HVR 結構類型；及選擇在非人類與人類可變區域之對應位置中，固定 HVR 結構類型與該非人類抗體的固定 HVR 結構類型相同之該人類序列。歸納上述，具有潛力之受體序列的選擇，係考量總體序列同源性較高者，並且，可以選擇參考受體序列中已存在之正確的規範殘基。在某些情況下，單純嫁接 HVR 將導致僅部份保留該非人類抗體之結合專一性。目前已發現至少部份特定的非人類骨架殘基對於維持其結合專一性是必要的，且必須一起嫁接入人類框架，即，在引入非人類 HVRs 時，必須加入所謂的「回復突變 (back mutation)」(例如，請見 Queen et al., PNAS 86 (1989), 10029-10033)。這些特定的骨架胺基酸殘基會參與 FR-HVR 交互作用，並穩定 HVRs 的結構 (環形)。在某些情況下，也會引入正向突變 (forward mutation)，以更接近人類生殖系序列。因此，「本發明之人類化抗體」(例如來源為小鼠) 係指一抗體，其係以小鼠抗體序列為基礎，並藉由如上所述之標準技術以人類化該抗體之 V_H 及 V_L (包含嫁接 HVR 及後續選擇性於骨架區域及 HVR-H1、HVR-H2、JVR-L1 或 HVR-L2 的特定胺基酸之突變，而其中 HVR-H3 及 HVR-L3 則維持未經修飾)。

【0074】 於某些實施例中，所提供之一抗體係為一嵌合抗體。某些嵌合抗體已記載於例如美國公告第 4,816,567 A 號專利案，以及 Morrison 等人所發表之期刊論文 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855) 之中。於一範例中，一嵌合抗體包含一非人類可變區域 (例如，衍生自小鼠、大鼠、倉鼠、兔子或如猴子之非人類之靈長類的一可變區域)，以及一人類不變區域。於另一範例中，一嵌合抗體係為一「類型轉換 (class switched)」之抗體，其類型或次類型 (subclass) 已自其母源抗體改變。嵌合抗體包含其抗原結合片段。

【0075】 於某些實施例中，所提供之一抗體係為一人類抗體，人類抗體可以經由多種本發明所屬技術領域中已知之方式製作。人類抗體之製

備，係能夠將一免疫原注射至一基因轉殖動物，該基因轉殖動物係經改良，而能夠針對抗原性挑戰（antigenic challenge）發生反應，產生完整人類抗體（intact human antibody），或產生具有人類可變區域之完整抗體。所述之動物通常包含全部或一部分人類免疫球蛋白位點（immunoglobulin loci），所述人類免疫球蛋白位點係取代該動物之內原性免疫球蛋白位點，或者，所述人類免疫球蛋白位點存在於染色體外或任意地插入該動物之染色體中。在基因轉殖小鼠中，其內原性免疫球蛋白位點通常是被調整為不活化的。關於藉由基因轉殖動物獲取人類抗體之方法，請參見 Lonberg, Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125、美國公告第 6,075,181 號及第 6,150,584 號專利案描述 XENOMOUSE™ 相關技術；美國公告第 5,770,429A 號專利案描述 HuMab® 相關技術；美國公告第 7,041,870A 號專利案描述 K-M MOUSE® 相關技術；及美國公開第 2007/0061900A1 號專利案描述 VelociMouse® 相關技術。上述動物所產生之完整抗體得人類可變區域可以再經過修飾，例如，結合至一個不同的人類固定區域。

【0076】 「人類抗體」係指擁有一胺基酸序列之一抗體，該胺基酸序列對應人類或人類細胞所產生之抗體的序列，或對應衍生自具有人類抗體譜（human antibody repertoire）之非人類來源抗體之的序列，或者其他編碼人類抗體之序列。上述人類抗體之定義，明確地排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。「人類共有骨架（human consensus framework）」係指在人類免疫球蛋白 V_L 或 V_H 骨架序列的一選群中，具有大多數共通存在胺基酸序列之一骨架。一般而言，人類免疫球蛋白 V_L 或 V_H 骨架序列的該選群，係選自可變域序列之一次類型。一般而言，序列之次類型係如 Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3 所述。於一實施例中，V_L 之次類型係為如前 Kabat 等人所述之 kappa I 次類型。於一實施例中，V_H 之

次類型係為如前 Kabat 等人所述之次類型 III。

【0077】 人類抗體亦可以藉由以雜交瘤為基礎之方法製作，人類單株抗體已可以經由人類骨髓瘤（myeloma）細胞株及小鼠－人類異型骨髓瘤（heteromyeloma）細胞株來製作，舉例而言，經由人類 B 細胞雜交瘤技術來製作人類抗體之描述可以參見 Li 等人所發表之期刊論文（Li et al, PNAS 103 (2006) 3557-3562），人類抗體亦可以下述之其它方法進行製作，舉例而言，以美國公告第 7,189,826 號專利案所揭露之以雜交瘤細胞株生產人類 IgM 單株抗體的方法，或以 Trioma 技術均可以用以製作人類抗體。此外，人類抗體另可以藉由分離選自人類衍生噬菌體呈現資料庫（phage display library）之 Fv 選殖株可變域序列來製作，所述之可變域序列續可以結合至所需之人類不變域。自抗體資料庫中選取人類抗體之技術係如後所述。

【0078】 本發明之抗體另可以藉由篩選組合資料庫（combinatorial library），以分離具有所需之活性的抗體。舉例而言，習知已有用以產生噬菌體呈現資料庫，以及篩選所述資料庫以獲取具有所需結合特性之抗體的多種方法，其方法另可以如 Fellouse 所發表之期刊論文（Fellouse, PNAS (2004) 12467-12472）所述。

【0079】 在某些噬菌體呈現資料庫中，係以聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction，簡稱 PCR）分別選殖 V_H 及 V_L 抗體譜，續於噬菌體資料庫中隨機地重組，而後可以篩選抗原結合噬菌體（antigen-binding phage）。噬菌體可以透過單鏈 Fv（single-chain Fv，簡稱 scFv）或以 Fab 片段之形式呈現抗原片段。藉由免疫來源之資料庫，無需構築雜交瘤，即可以提供對於免疫原有高親和力之抗體。或者，可以選殖原有抗體譜（naive repertoire，例如自人類選殖），無需經過任何免疫步驟，即可以提供針對一大範圍之非自體及自體抗原（non-self and self-antigen）之單一抗體來源。最後，亦可以藉由人為地自幹細胞選殖未重整之 V 基因

片段 (non-rearranged V-gene segment) 以製備原有抗體譜資料庫 (naive libraries), 並使用包含隨機續列之 PCR 引子對以編碼高度變異之 CDR3 區域, 以及在體外完成重整。其他例如: 美國公告第 5,750,373 A 號、公開第 2005/0079574 A1 號、第 2005/0119455 A1 號、第 2005/0266000 A1 號、第 2007/0117126 A1 號、第 2007/0160598 A1 號、第 2007/0237764 A1 號、第 2007/0292936 A1 號及第 2009/0002360 A1 號等專利案亦為描述人類抗體噬菌體資料庫之公開文獻。於此, 分離自人類抗體資料庫的抗體及抗體片段係認定為人類抗體或人類抗體片段。

【0080】 於某些實施例中, 所提供之一抗體係為一多重專一性 (multi-specific) 抗體, 例如一雙重專一性 (bi-specific) 抗體。多重專一性抗體係指至少兩個以上的位置皆具有結合專一性之單株抗體。於某些實施例中, 其中之一的結合專一性係針對前述之一抗原表位, 而另一的結合專一性則係針對前述之另一抗原表位, 或針對任何其他抗原。雙重專一性抗體係能夠製備為全長之抗體, 或為抗體之片段。用以製作多重專一性抗體之技術包含: 如 PCT 公開第 93/08829 A 號及美國公告第 5,731,168 A 號專利案之重組共表現 (co-expression) 分別具有不同的專一性的兩對免疫球蛋白重鏈-輕鏈對, 但不以此為限。多重專一性抗體另可以經由如 PCT 公開第 2009/89004 A 號專利案之設計靜電導引效應 (electrostatic steering effect) 以製作抗體 Fc-異型二聚體 (Fc-heterodimeric) 分子、如美國公告第 4,676,980 A 號專利案之交叉連結 (cross-linking) 二或多個抗體或片段、以白胺酸拉鏈 (leucine zipper) 製作雙重專一性抗體、如 Holliger 等人所發表之期刊文獻 (Holliger et al, PNAS 90 (1993) 6444-6448) 之以雙體抗體 (diabody) 技術製作雙重專一性抗體片段、使用單鏈 Fv (single-chain, 簡稱 sFv) 二聚體, 以及製作三重專一性抗體 (tri-specific antibody) 等方式製作而成。經設計包含三或更多功能性抗原結合位之抗體, 包含例如美國

公開第 2006/0025576 A1 號專利案之章魚抗體 (Octopus antibody) 亦包含於此。此處所述之抗體或片段另包含一雙重作用 Fab (Dual Acting Fab, 簡稱 DAF), 其包含一抗原結合位, 可以結合至前述之一抗原表位及另一個不同抗原 (請見如美國公開第 2008/0069820 A1 專利案)。此處所述之抗體另及片段亦包含如 PCT 公開第 2009/080251 A 號、第 2009/080252 A 號、第 2009/080253 A 號、第 2009/080254 A 號、第 2010/112193 A 號、第 2010/115589 A 號、第 2010/136172 A 號、第 2010/145792 A 號及第 2010/145793 A 號等專利案所記載之多重專一性抗體。

【0081】 抗體之功能性片段係指能夠結合至對應之抗原表位的片段, 所述片段於化學穩定性 (chemical stability)、藥學半生期 (pharmaceutical half-life)、劑量或製造方便等面向皆較全長之抗體具有優勢; 舉例而言, 所述之片段可以指 Fab 片段、單域抗體及衍生自一抗體之不變區域之結合域 (例如 Fcab™)。

【0082】 因此, 本發明之另一較佳實施例係為一抗體片段, 較佳係為一單域抗體 (single-domain antibody) 之片段, 其中, 該片段係對於下述具有專一性: (A) MmpOpn (具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列), 其中該片段對於 MmpOpn 的反應性高於其對於 flOpn (具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列) 的反應性及其對於 ThrOpn (具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列) 的反應性; 或 (B) MmpOpn 及 ThrOpn, 其中該片段對於 MmpOpn 的反應性及其對於 ThrOpn 的反應性皆高於其對於 flOpn 的反應性; 或 (C) ThrOpn, 其中該片段對於 ThrOpn 的反應性高於其對於 flOpn 的反應性及其對於 MmpOpn 的反應性。

【0083】 本發明之片段亦包含如 III 等人之「Kappa bodies」(III et al., Protein Eng. 10: 949-57 (1997))、Martin 等人之「Minibodies」(Martin et al., EMBO J. 13: 5303-9 (1994))、Holliger 等人之「Diabodies」(Holliger et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)) 或 Traunecker 等人之「Janusins」(Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991)及 Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)), 且係能夠依據說明書之教示, 藉由標準分子生物技術製備上述片段。

【0084】 適用於本發明的經設計之抗體, 另可以參考 Hollinger & Hudson (Nat Biotechnol. 2005, PMID: 16151406) 之綜述。

【0085】 於本發明另一較佳實施例中, 本發明之抗體(或抗體片段)的至少一胺基酸殘基、一 N 端及/或 C 端係可以經本發明所屬技術領域之任何習知方法進行化學修飾, 所述之化學修飾包含糖基化、聚乙二醇化(pegylation)、生物素化(biotinylation)、烴化、羥基化、腺甘酸化(adenylation)、磷酸化、琥珀醯化(uccinylation)、氧化或醯基化的其中之一或多種, 更具體為乙醯化, 藉此可以提升本發明之抗體的藥學性質(例如溶解度、半生期、活性)。

【0086】 於某些實施例中, 所提供之抗體係具有胺基酸序列的變異。舉例而言, 藉由胺基酸序列之變異以改善該抗體之結合親和力及/或其他生物學性質。係可以於編碼該抗體之核苷酸序列中引入適當之修飾, 或者經由胜肽合成以製作一抗體之胺基酸序列變異體。所述之修飾包含, 舉例而言, 刪除及/或插入及/或置換該抗體之胺基酸序列中的殘基, 並經由刪除、插入及置換之任何組合以完成該最終構築體, 且該最終構築體擁有所需之特性, 例如抗原結合性。

【0087】 於某些實施例中, 係提供具有一或多個胺基酸置換的抗體變異體, 所選擇之置換突變位置包含 HVRs 及 FRs。第 1 表之「較佳置換」欄位列出數種保守置換(conservative substitution), 參考胺基酸側鏈之類型, 更多的實質改變係如下述。可以於所選定之一抗體中引入胺基酸置換, 並篩選其產物, 以獲取所需之活性。例如, 維持/提升抗原結合、降低其

致免疫力，或者改善 ADCC 或 CDC。

【0088】

原始胺基酸		置換範例	較佳置換
Ala (A)	丙胺酸	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	精胺酸	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	天門冬醯胺	Gln、His、Asp、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	天門冬胺酸	Glu、Asn	Glu
Cys (C)	半胱胺酸	Ser、Ala	Ser
Gln (Q)	穀胺醯胺	Asn、Glu	Asn
Glu (E)	穀胺酸	Asp、Gln	Asp
Gly (G)	甘胺酸	Ala	Ala
His (H)	組胺酸	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	異白胺酸	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正白胺酸 (Norleucine)	Leu
Leu (L)	白胺酸	正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys (K)	賴胺酸	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	甲硫胺酸	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	苯丙胺酸	Trp、Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Tyr
Pro (P)	脯胺酸	Ala	Ala
Ser (S)	絲胺酸	Thr	Thr
Thr (T)	蘇胺酸	Val、Ser	Ser
Trp (W)	色胺酸	Tyr、Phe	Tyr
Tyr (Y)	酪胺酸	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	纈胺酸	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、正白胺酸	Leu

【0089】 胺基酸可以依據共通之側鏈性質分類：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 會影響長鏈方向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0090】 非保守置換 (non-conservative substitution) 係將一定數量之胺基酸，自上述類型的其中之一交換成另一類型。其中一種置換變異，係置換一母源抗體 (例如，一人類化抗體或人類抗體) 的一或多個高度可變區域殘基。一般而言，其所產生之變異體中被挑選進行進一步的研究者，相對於母源抗體會具有某些經改變 (例如改善) 之生物學性質 (例如，親和力上升、致免疫原性降低)，及／或大致上保留某些母源抗體之生物學性質。置換變異的一個範例係為親和力成熟 (affinity matured) 之一抗體，且該抗體可以方便地製備，例如，藉由以噬菌體呈現為基礎之親和力成熟作用 (affinity maturation) 技術製備，敘述如後。簡略言之，係突變一或多 HVR 殘基，並以噬菌體呈現這些變異抗體，並針對特定之生物學活性 (例如結合親和力) 進行篩選。例如，對 HVR 進行變更 (例如置換)，以提升抗體親和力。這些變異可以選擇在 HVR 之熱點 (hotspot，即，在體內之成熟過程中，突變機率較高之密碼子所編碼的殘基) 進行，及／或 SDR (a-CDRs)，並測試所產生之變異 V_H 及 V_L 的結合親和力。親和力成熟化則係於二級資料庫 (secondary library) 中進行構築及再選擇 (reselecting)。於親合力成熟化之某些實施例中，係能夠藉由許多種方法，例如易錯聚合酶鏈鎖反應 (error-prone PCR)、鏈重組 (chain-shuffling) 或寡核苷酸定點突變 (oligonucleotide-directed mutagenesis)，以於選擇進行突變的可變基因中引入多樣性，進而產生一個二級資料庫。續對該二級資料庫進行篩選，

以獲取具有所需親合力之任何抗體變異體。另一個引入多樣性的方法，係關於 HVR 引導 (HVR-directed) 之方法，係使數個 HVR 殘基 (例如一次選取 4~6 個殘基) 進行隨機分布，參與抗原結合之 HVR 殘基可以透過如丙胺酸掃描式突變 (alanine scanning mutagenesis) 或模型建立 (modelling) 等方法被明確地辨識。具體而言，通常針對 CDR-H3 及 CDR-L3。

【0091】於某些實施例中，在這些改變不會實質地影響該抗體結合抗原之活性的前提條件下，置換、插入或刪除可以發生在一或多個 HVRs 中；舉例而言，可以於 HVRs 中產生不會實質降低結合親和力的保守改變 (conservative alteration)，此保守改變可以為如此處所述之保守置換，這樣的改變亦可能位於 HVR 之熱點或 SDR 以外的部份。於某些實施例中，變異的 V_H 及 V_L 之序列係如上所述，各 HVR 可能為未改變或可以包含不超過一、二或三個胺基酸置換。所謂的「丙胺酸掃描式突變」係為一種實用的方法，可以辨識一抗體中能夠作為突變標的之殘基或區域；其中，係選取一殘基或一組標的殘基 (例如 Arg、Asp、His、Lys 及 Glu 等帶電荷之殘基)，並以一中性或帶負電荷之胺基酸 (例如丙胺酸或聚丙胺酸) 取代以判定該抗體與抗原之交互作用是否受到影響。在對於初始之置換有功能之胺基酸位置上，可以再引入進一步的置換。或者，或可以同時進行，以一抗原-抗體複合體之晶體結構來辨識抗原與抗體間的接觸點。這些接觸殘基以及鄰近的殘基可以做為置換標的之候選，或者從置換之標的中刪除。這些變異體會經過篩選，以判定是否含有所需之特性。胺基酸序列插入包含胺基端及/或羧基端之融合，其長度可以小至一個殘基，大至包含一百或以上殘基的聚勝肽，亦可以是於序列間插入單一或複數個胺基酸。末端插入的範例包含具有一 N 端甲硫胺酸殘基之一抗體。其他的抗體分子之插入變異體則包含將抗體的 N 端或 C 端與一酵素 (例如 ADEPT) 或一聚勝肽融合，以提高該抗體於血清中之半衰期。

【0092】 本發明之抗體以一藥學組合物的型式提供是較有利的，例如，可以提升該抗體在儲存時之穩定性。因此，另一較佳實施例係提供一藥學組合物，包含本發明之抗體或片段，另包含一或多種賦型劑。

【0093】 「藥學組合物」一詞係指任何組合物或製劑，其包含如前所定義之一抗體，且可以改善、治癒或預防此處所述之情況。具體而言，「藥學組合物」之表述方式係指一組合物，其包含本發明之一抗體及一藥學可接受之賦型劑。合適之賦型劑的選擇係屬於本發明所屬技術領域之通常知識，例如可以為水（特別如注射水）、鹽水（saline）、林格氏液（Ringer's solution）、葡萄糖溶液、緩衝液、漢克氏溶液（Hank solution）、可以形成囊泡（vesicle）之化合物（例如脂質）、定性油（fixed oil）、乙基油酸酯（ethyl oleate）、包含 5%葡萄糖之鹽水、可以增強等張性（isotonicity）及化學穩定性之物質、緩衝液及防腐劑。其他的賦型劑另包含不會在病患體內造成對病患有害之抗體生成的任何化合物，舉例而言，可以為耐受性高之蛋白、多醣、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚體胺基酸及胺基酸共聚合物。所述之藥學組合物或本發明之抗體可以（以一藥物之形式）透過適當之程序投予所需病患（例如患有此處所述之疾病或情況或有患病之風險的病患），投藥之程序係為本發明所屬技術領域之通常知識。所述之病患較佳為人類。

【0094】 本發明之組合物的投藥途徑較佳係為非腸胃之投予，具體而言，係透過靜脈內或皮下投藥。為適用於非腸胃之投予，本發明之藥學組合物係以可注射劑量單位之形式提供，例如結合前述所定義的藥學可接受之賦型劑以形成一溶液、懸浮液或乳劑。然而，投藥之劑量及方法係依據所治療之個別病患而有所不同。

【0095】 本發明之抗體係能夠以任何自其他 mAb 之劑量療程所得知的合適劑量進行投藥，或針對一給定病患進行特別定量及改善。舉例而言，本發明之 mAbs 係能夠以下述劑量之形式提供（或以下述劑量應用）：自 1

mg 至 10 g 之總量，較佳為 50 mg 至 2 g，具體為 100 mg 至 1g。通常劑量亦可以依據病患之體重決定，例如較佳劑量之範圍係為（每個投藥期，per administration session）每公斤體重投予 0.1~100 mg，特別係每公斤體重投予 1~10 mg。

【0096】 由於本發明組合物的較佳投藥方式係為非腸胃之投予，故本發明之藥學組合物較佳係為液體，或能夠迅速溶解於液體之形式，例如溶解於滅菌水、去離子水或蒸餾水或經滅菌之等滲透壓磷酸鹽緩衝溶液（phosphate-buffered saline，簡稱 PBS）。較佳地，每 1000 μg （乾重）之該組合物包含或由 0.1~990 μg 本發明之抗體所組成，較佳為包含或由 1~900 μg 本發明之抗體所組成，更佳為包含或由 10~200 μg 本發明之抗體所組成；並可以選擇添加 1~500 μg 之（緩衝）鹽類，較佳為 1~100 μg 之（緩衝）鹽類，更佳為 5~15 μg 之（緩衝）鹽類（以於最終體積形成一等滲透壓緩衝溶液）；以及選擇性添加 0.1~999.9 μg 之其它賦型劑，較佳為 100~999.9 μg 之其它賦型劑，更佳為 200~999 μg 之其它賦型劑。較佳地，100 mg 之乾燥組合物係溶於經滅菌之去離子／蒸餾水或經滅菌之等滲透壓磷酸鹽緩衝溶液（PBS）以形成最終體積為 0.1~100 ml，較佳為 0.5~20 ml，更佳為 1~10 ml 之溶液。

【0097】 由於就選擇性及致免原性而言，本發明課題所發現及／或表現其特徵之某些抗原表位係特別適合於抗體之生產，故本發明之另一面向係考慮使用上述抗原表位於主動免疫（active approach）之方法（即，疫苗）。

【0098】 是以，本發明另提供一種疫苗，包含至少一經分離之 Opn 胜肽：(A) 該至少一經分離之 Opn 胜肽具有選自由 GDSVVYG·RGDSVVYG 及 DGRGDSVVYG 所組成之群組（如 SEQ ID NOs：7~9 所示之序列）及 GRGDSVVYG（如 SEQ ID NO：55 所示之序列）的一或多個序列；及／或 (B) 該至少一經分離之 Opn 胜肽具有選自由 TYDGRGDSVVYG（如 SEQ

ID NO : 10 所示之序列)、 VDTYDGRGDSVV (如 SEQ ID NO : 13 所示之序列)、 PTVDTYDGRGDS (如 SEQ ID NO : 14 所示之序列)、 DTYDGRGDSVVY (如 SEQ ID NO : 56 所示之序列) 及 VDTYDGRGDSV (如 SEQ ID NO : 57 所示之序列) 所組成之群組之一或多個序列, 其中該胜肽, 特別是序列為 VDTYDGRGDSVV (如 SEQ ID NO : 13 所示之序列) 或 PTVDTYDGRGDS (如 SEQ ID NO : 14 所示之序列) 之該胜肽, 其 C 端較佳係經醯胺化 (以形成 R-COO-NH₂, 其中 R 係為不包含其 C 端羧基之該胜肽); 及/或(C)該至少一經分離之 Opn 胜肽具有選自由 VVYGLR、SVVYGLR 及 DSVVYGLR 所組成之群組 (如 SEQ ID NOs : 1~3 所示之序列) 及 GDSVVYGLR (如 SEQ ID NO : 58 所示之序列) 之一或多個序列; 及該胜肽係結合於一藥學可接受之載劑。上述抗原表位由於可以預期能夠於患者中, 針對 ThrOpn、MmpOpn 或同時針對上述二者皆引發強烈且具選擇性之免疫反應, 而對於 flnOpn 所引發的反應則較低, 因而具有高度合適性。

【0099】 在本發明之前, 尚無針對經由 Thr 或 Mmp 所切割而暴露的該隱蔽域、或同時針對上述二者所切割而暴露的該隱蔽域具有專一性之疫苗, 或於該隱蔽域之背景下提及該 RGD 區域之內容, 曾被本發明所屬技術領域中之通常知識者所知悉。

【0100】 PCT 公開第 02/25285 A1 號專利案係關於一種用於癌症轉移的預後指示劑, 其包含一種直接抗 Opn 的抗體。上述文件第 6ff 頁教示包含一抗原性胜肽之一種疫苗, 該疫苗會產生一種直接抗 Opn 的抗體。該文件僅關於癌症的治療, 此外, 該文件僅提及該胜肽可以衍生自 Opn 的一 N 端序列, 該 N 端序列與本發明之疫苗的胜肽係距離 100 個胺基酸以上。具體而言, 該文件教示該胜肽較佳係衍生自 N 端之原因為「該胺基酸係暴露於胞外」, 其明顯忽略了 Opn 係經分泌且選擇性地經凝血酶等蛋白酶切割

之事實。

【0101】 此外，本發明之疫苗所誘發的免疫血清，如此處所顯示，係對於 Opn 的截斷變異體 (MmpOpn、ThrOpn 或二者皆是) 具有專一性，同時對於該全長蛋白 (flOpn) 的反應性較低 (例如，請見第 1 圖及範例 1)。因此在治療時能夠作為一種準度極佳的方法，降低病患使用本發明之疫苗時的副作用。

【0102】 因此，本發明之「疫苗」組合物亦可以是一「致免疫原性之組合物」，即，一組合物，該組合物能夠應用於一人類個體，以使該人類個體發生免疫反應。然而，應了解在一族群中，該組合物使一人類個體發生免疫反應之能力會有大幅度的變動。依據上述，本發明之「致免疫原性之組合物」係指於一給定族群中，於給予該致免疫原性之組合物後，至少 10% 之個體，較佳為至少 20% 之個體，更佳為至少 30% 之個體，特別係至少 50% 之個體能夠偵測到免疫反應，例如該個體的免疫系統針對給予之該胜肽，能夠產生具專一性之抗體。

【0103】 較佳地，本發明之疫苗中的一或多個胜肽之 C 端係經醯胺化，特別是序列為 TYDGRGDSVYVG 或 PTVDTYDGRGDS 之該胜肽，以於免疫反應中，引導該抗體對於該胜肽之更中間的部份產生反應。於另一較佳實施例中，本發明之疫苗中的一或多個胜肽係具有本發明所屬技術領域中已知之修飾，所述修飾係包含一或多個糖基化、聚乙二醇化、生物素化、烴化、羥基化、腺甘酸化、磷酸化、琥珀醯化、氧化或醯基化，更具體為乙醯化，其可以提升本發明之疫苗的藥學性質。

【0104】 依據本發明，該胜肽係結合或融合於一藥學可接受之載劑。較佳地，該藥學可接受載劑係為鑰孔血藍素 (keyhole limpet haemocyanin, KLH)、破傷風類病毒 (tetanus toxoid, TT)、白蛋白結合蛋白 (albumin binding protein)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)、一樹枝狀體 (dendrimer，

MAP; Biol.Chem. 358:581) 中的一或多者，以及如 Singh & O'Hagan 等人於 1999 所發表之佐劑物質 (adjuvant substance, 特別係該文獻中第 1 表所列) 或如 O'Hagan & Valiante 等人於 2003 所發表之佐劑物質 (特別係其中所述之具有固有免疫潛力之化合物及輸送系統，或可以使用其混合物，例如低溶解度之鋁組合物 (例如，氫氧化鋁) MF59 磷酸鋁、磷酸鈣、細胞激素 (例如 IL-2、IL-12、GM-CSF)、皂素 (saponin, 例如 QS21)、MDP 衍生物、CpG 寡聚物、IC31、LPS、MPL、鯊烯、D,L-alpha-生育酚 (D,L-alpha-tocopherol, 例如混合於伴隨磷酸鹽緩衝液之水包油 (oil-in-water) 系統)、聚磷腈 (polyphosphazene)、乳劑 (例如 Freund's、SAF)、脂載體 (liposome)、病毒顆粒 (virosome)、免疫刺激複合物 (immunostimulating complex, 簡稱 ISCOMS)、螺旋物 (cochleate)、PLG 微粒子 (PLG microparticle)、泊洛沙姆顆粒 (poloxamer particle)、類病毒粒子 (virus-like particle)、熱不穩定腸毒素 (heat-labile enterotoxin, 簡稱 LT)、霍亂毒素 (cholera toxin, 簡稱 CT)、突變毒素 (mutant toxin, 例如 LTK63 及 LTR72)、微粒子及 / 或聚合之脂載體)。本發明一較佳實施例中，該疫苗組合物係包含氫氧化鋁。較佳地，該胜肽係共價鍵結或融合於該載劑。

【0105】 於一具體較佳實施例中，本發明之疫苗中的至少一胜肽具有一半胱胺酸添加於其 N 端及 / 或 C 端，且該至少一胜肽係透過該半胱胺酸共價鍵結於該蛋白載劑或結合於該蛋白載劑之一連接片段 (linker)。該連接片段較佳包含與該胜肽之半胱胺酸反應之一順丁烯二醯亞胺基團 (maleimide group) 或一鹵化乙酰基團 (haloacetyl group)。

【0106】 提供本發明之疫苗混合添加之賦型劑是具有優點的，例如可以提升該抗體於儲存時之穩定性。是以，另一較佳實施例提供本發明之疫苗，另包含一或多種藥學可接受之賦型劑及 / 或佐劑。

【0107】 合適之賦型劑的選擇係屬於本發明所屬技術領域之通常知

識，例如可以為水（特別如注射水）、鹽水、林格氏液、葡萄糖溶液、緩衝液、漢克氏溶液、可以形成囊胞之化合物（例如脂質）、定性油、乙基油酸脂、包含 5% 葡萄糖之鹽水、可以增強等張性及化學穩定性之物質、緩衝液及防腐劑。其他的賦型劑另包含不會在病患體內造成對病患有害之抗體生成的任何化合物，舉例而言，可以為耐受性高之蛋白、多醣、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚體胺基酸及胺基酸共聚合物。所述之疫苗可以（以一藥物之形式）透過適當之程序投予所需病患（例如患有此處所述之疾病或情況或有患病之風險的病患），投藥之程序係為本發明所屬技術領域之通常知識。所述之病患較佳為人類。

【0108】 本發明之疫苗較佳係與一佐劑共同製造，更佳係與一低溶解度之鋁組成物共同製造，具體係與氫氧化鋁共同製造。此外，當然也可以使用如 MF59、磷酸鋁、磷酸鈣、細胞激素（例如 IL-2、IL-12、GM-CSF）、皂素（例如 QS21）、MDP 衍生物、CpG 核酸寡聚物、IC31、LPS、MPL、聚磷腈、乳劑（例如 Freund's、SAF）、脂載體、病毒顆粒、ISCOMS、螺旋物、PLG 微粒子、泊洛沙姆顆粒、類病毒粒子、LT、CT、突變毒素（例如 LTK63 及 LTR72）、微粒子及／或聚合之脂載體等載體。

【0109】 合適之佐劑係為商業上可取得者，例如 AS01B、AS02A、AS15、AS-2 及其衍生物（購自 GlaxoSmithKline，費城，PA）；CWS、TDM、Leif、氫氧化鋁膠（aluminum hydroxide gel，alum）或磷酸鋁等鋁鹽；鈣、鐵或鋅之鹽類；丙烯酸化之酪胺酸（acylated tyrosine）的不可溶懸浮溶液；丙烯酸化之糖類（acylated suager）；多醣類衍生之陰離子或陽離子（cationically or anionically derivatized polysaccharides）；聚磷腈；生物可分解之微球（biodegradable microspheres）；單磷酸化之脂質 A（monophosphoryl lipid A）及皂苷 A（quil A）。如 GM-CSF 或介白素-2、介白素-7 或介白素-12 等生物激素亦可以作為該佐劑。

【0110】 另一種合適的佐劑係為一皂素或皂素擬似物 (saponin mimetics) 或皂素衍生物，較佳為 QS21 (購自 Aquila Biopharmaceuticals Inc.)，其可以單獨使用或與其他佐劑組合。舉例而言，一種經強化之系統係包含一磷酸化脂質 A 及皂素衍生物之組合，例如 PCT 公開第 94/00153 號專利案所述之 QS21 及 3D-MPL 之組合，或如 PCT 公開第 96/33739 號專利案所述反應原性 (reactogenic) 較低之組合物，其中該 QS21 係經膽固醇抑制。其他較佳配方包含一水包油乳劑及生育醇，特別具有潛力之佐劑配方係如 PCT 公開第 95/17210 號專利案所述之包含 QS21、3D-MPL 及生育醇於一水包油乳劑中。本發明所使用之皂素佐劑另包含如 PCT 公開第 96/33739 號及第 96/11711 號專利案所述之 QS7、及如美國公告第 5,057,540 號及歐盟公告第 0 362 279 B1 號專利案所述之 QS17。

【0111】 其他較佳之佐劑包含 Montanide ISA 720 (購自 Seppic, 法國)、SAF (購自 Chiron, 加州, 美國)、ISCOMS (購自 CSL)、MF-59 (購自 Chiron)、SBAS 系列之佐劑(例如 SBAS-2、AS2'、AS2、SBAS-4 或 SBAS6 可以自 GlaxoSmithKline 購得)、Detox(購自 Corixa)、RC-529(購自 Corixa, 漢米敦, MT)及其他烷基氨基葡萄糖苷 4-磷酸鹽(amino-alkyl glucosaminide 4-phosphates, 簡稱 AGPs)。更多之佐劑範例包含合成之 MPL, 及以志賀毒素 B 次單元 (Shiga toxin B subunit) 為基礎之佐劑 (請見 PCT 公開第 2005/112991 號專利案)。

【0112】 本發明之疫苗另可以透過任何合適的應用模式投藥，例如皮內 (intradermally, 簡稱 i.d.)、腹膜內 (intraperitoneally, 簡稱 i.p.)、肌內 (intramuscularly, 簡稱 i.m.)、鼻內 (intranasally)、口服、皮下 (subcutaneously, 簡稱 s.c.) 等投藥方式，及任何合適之投藥裝置 (O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9), (2003), 727-735)。本發明之疫苗較佳係製造用於皮內、皮下或肌內投藥。上述各投藥方式，及用於上述

各投藥方式的製劑之製作方法，係為本發明所屬技術領域中之通常知識(例如，請見“Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations”, Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc, 2004)。

【0113】 本發明之疫苗係以可注射劑量單位之形式提供，例如一溶液、懸浮液或乳劑，較佳係與上述定義之藥學可接受賦型劑及／或佐劑共同配製。然而，投藥之劑量及方法係依據所治療之個別病患而有所不同。

【0114】 較典型地，該疫苗包含本發明之一或多個胜肽，各胜肽之總量係為 0.1 ng 至 10 mg，較佳為 10 ng 至 1 mg，特別為 100 ng 至 100 μ g，或者，係為 100 fmole 至 10 μ mole，較佳為 10 pmole 至 1 μ mole，特別為 100 pmole 至 100 nmole。

【0115】 該疫苗另可以包含典型之輔助物質，例如緩衝劑、穩定劑等。

【0116】 用於與該載劑物質混合以製造單一劑量形式之胜肽的總量會依據所治療之主體及投藥之具體模式而改變，而該疫苗之劑量會依據如疾病情勢及個體之年齡、性別、體重，以及抗體於該個體中引發所需反應之能力等變因而改變。劑量療程可以經調整以提供最佳之治療反應，舉例而言，以每天、每週或每月，或其他選定之時間間隔投予數個分割劑量，或者，該劑量可以依據治療情形之緊急需要而成比例地減少。該疫苗之劑量亦可以依狀況而變動，以提供最佳之預防劑量反應。例如，本發明之胜肽及疫苗係可以持續依據對應抗原之抗體的濃度，以數天、一或兩週甚或數個月之間隔投予一個體。

【0117】 由於本發明之疫苗的較佳投藥方式係為注射投藥，故本發明之疫苗較佳係為液體，或能夠迅速溶解於液體之形式，例如能夠溶解於滅菌水、去離子水或蒸餾水或經滅菌之等滲透壓磷酸鹽緩衝溶液 (PBS)。較佳地，每 1000 μ g (乾重) 之該疫苗包含或由 0.1~990 μ g 本發明之胜肽所組成，較佳為包含或由 1~900 μ g 本發明之胜肽所組成，更佳為包含或由

10~200 μg 本發明之胜肽所組成；並可以選擇添加 1~500 μg 之（緩衝）鹽類，較佳為添加 1~100 μg 之（緩衝）鹽類，更佳為添加 5~15 μg 之（緩衝）鹽類（以於最終體積形成一等滲透壓緩衝溶液）；以及選擇性添加 0.1~999.9 μg 之其它賦型劑，較佳為添加 100~999.9 μg 之其它賦型劑，更佳為添加 200~999 μg 之其它賦型劑。較佳地，1 mg 之乾燥疫苗係溶於經滅菌之去離子／蒸餾水或經滅菌之等滲透壓磷酸鹽緩衝溶液（PBS）以形成最終體積為 0.1~100 ml，較佳為 0.5~20 ml，更佳為 1~10 ml 之溶液。

【0118】 依據本發明之一具體較佳實施例，該疫苗可以包含下列組成／特性中的二者或以上：

抗原(每劑量之胜肽總量)	胜肽淨重為 0.1 μg 至 1 mg，較佳為 0.5 μg 至 500 μg ，更佳為 1 μg 至 100 μg
載劑	任何本發明所屬技術領域之通常知識者已知，且藥學及醫學上可接受者
每劑量之載劑	0.1 μg 至 50 mg 之載劑
佐劑／每劑量之總量	任何藥學及醫學上可接受者
注射體積	任何醫學上可接受者（且依據應用路徑）
緩衝劑	任何醫學及藥學上可接受者

【0119】 Opn、MmpOpn 及 ThrOpn 皆參與人體中的致病原性之過程，其細節係已詳述如上。再且，本案實施方式及圖示顯示本發明之疫苗及抗體是有功用的。因此，本發明之組合物或疫苗係較佳用於治療，具體而言係用於治療及／或預防心血管疾病或 T2D，該心血管疾病特別係動脈粥狀硬化，該 T2D 特別係肥胖症相關之胰島素抗性。

【0120】 本發明之另一面向，係提供一種本發明之抗體的製造方法，包含：

— 以細胞培養表現該單株抗體，

— 純化該單株抗體。

mAb 的表現及純化係為本發明所屬技術領域之通常知識，例如，Birch 及 Racher 所揭露之大量抗體生產之綜述（表現及純化）（請見 Birch & Racher, *Adv Drug Deliv Rev* 2006, PMID: 16822577）。包含習用 mAb 方法之技術，例如 Köhler 及 Milstein 所述之標準體細胞雜交技術（standard somatic cell hybridization, Köhler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495）。其他製作 mAb 的技術另可以使用經病毒或致腫瘤物（oncogenic）轉型之 B 淋巴細胞。

【0121】 本發明之另一面向，係提供一種本發明之疫苗的製造方法，包含：

- 提供該胜肽；
- 將該胜肽結合於該載劑，較佳係為 KLH 蛋白；
- 選擇性地添加藥學可接受之賦型劑。

【0122】 以化學合成法製作本發明之胜肽係為本發明所屬技術領域之通常知識，同時當然能夠以重組方法製作該胜肽。該胜肽能夠以細菌、酵母菌或真菌等微生物製作，或以哺乳類或昆蟲細胞等真核細胞製作，或者，以腺病毒（adenovirus）、痘病毒（poxvirus）、疱疹病毒（herpesvirus）、塞姆利基森林病毒（Simliki forest virus）、桿狀病毒（baculovirus）、噬菌體、辛德畢斯病毒（Sindbis virus）或仙台病毒（Sendai virus）等重組病毒載體（recombinant virus vector）製作。其中，適合製作該胜肽的細菌包含大腸桿菌（*E. coli*）、枯草桿菌（*B. subtilis*）或任何其他能夠表現該胜肽之細菌。適合製作本發明之胜肽的酵母菌包含釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、念珠菌（*Candida*）、嗜甲醇酵母（*Pichia pastoris*）或任何其他能夠表現該胜肽之酵母菌。上述相關之定義及方法係為本發明所屬技術領域之通常知識，其分離及純化重組製造之胜肽的方法亦為本發明所屬技術領域之通常知識，

包含例如凝膠過濾、親和力色層分析、離子交換色層分析等。較佳地，係於該抗原表位胜肽添加半胱胺酸殘基，以促進該抗原表位胜肽結合至該載劑，特別係將半胱胺酸殘基添加於該 N 及／或 C 端。

【0123】 為促進所述胜肽的分離，係可以製作融合聚胜肽，其中該胜肽係轉譯地融合（共價連結）至一異源性（heterologous）聚胜肽，該異源性聚胜肽可以促進親合力色層分析之分離。典型的異源性聚胜肽係為 His 標記（His-Tag：例如 His6；六個組胺酸殘基）、GST 標記（GST-Tag：穀胱甘肽-S-轉移酶，Glutathione-S-transferase）等。該融合聚胜肽不僅有助於該胜肽之純化，亦可以防止該胜肽於純化過程中降解。若需要在純化步驟後去除該異源性聚胜肽，該融合聚胜肽於該胜肽與該異源性聚胜肽之連接處可以包含一個切割位。所述之切割位係由一胺基酸序列所組成，該胺基酸序列可以被一酵素（例如蛋白酶）專一性地辨識及切割。

【0124】 此處所述之連結／結合化學（coupling/conjugation，例如經由異型雙功能（heterobifunctional）化合物，如 GMBS 或其他如“Bioconjugate Techniques”，Greg T. Hermanson 所記載），係可以選自本發明所屬技術領域中已知之反應。藥學可接受之賦型劑之細節已如上述，其係為本發明所屬技術領域中之通常知識者可以理解。

【0125】 本發明之抗體亦可以用於疾病的診斷及／或預後，其涉及 ThrOpn 或 MmpOpn 或同時二者於病患體內之濃度變化（如第 6 圖及範例 6 所示）。因此，本發明之另一面向，係提供一種診斷方法，包含：提供該病患之一分離樣品，較佳係來自血液及／或脂肪組織之樣品，特別係來自皮下脂肪組織；使用申請專利範圍第 1~10 項之任一項之該單株抗體測量該樣品中 ThrOpn、MmpOpn 之濃度及／或 ThrOpn 及 MmpOpn 之聚集濃度，較佳係透過 ELISA 或西方墨點法（Western blot）；將上述濃度與一健康之控制族群的濃度及／或該病患於早前時間點之濃度做比較；產生一診斷或

預後，該診斷或預後係針對一疾病或狀態或針對該疾病或狀態之進程，較佳係針對心血管疾病，更具體為動脈粥狀硬化，或針對第二型糖尿病，更具體為肥胖症相關之胰島素抗性。該病患較佳係為人類。

【0126】 在西方墨點法中，待診斷所述疾病或狀態（即，涉及經切割之骨調素的濃度異常之疾病，特別是肥胖症相關之胰島素抗性及／或動脈粥狀硬化）之病患的樣品，其條帶強度相對於適當之對照組會顯著上升（請見第 6 圖及範例 6）。較典型地，該條帶強度相較於合適之對照組係提高至少 25%，具體為提高 50%或提高 75%。本發明所屬技術領域中具有通常知識者當可以理解，患有所述疾病或狀態之病患的樣品，相對於控制組之實際差異會依據許多變因而變化，例如量測抗體結合之方式、樣品處理等，且可以輕易對應上述變因調整本發明之方法，包含其他測量抗體結合之方法（例如藉由 ELISA）。

【0127】 所述之方法係非實施於病患之體內或體表。

【0128】 較佳地，本方法係用於監控任何此處所述之治療方法的成效。

【0129】 一般而言，用以產生本發明之一抗體的胜肽或用以作為本發明之一疫苗成份的胜肽，該胜肽之 C 端可以經醯胺化，或者經本發明所屬技術領域已知之修飾。特別係具有 TYDGRGDSVYVG 及 PTVDTYDGRGDS 序列之該胜肽，其 C 端可以經醯胺化，以於免疫反應中，引導該抗體對於該胜肽之更中間的部份產生反應。

【0130】 此外，本發明之該抗體及疫苗係以經分離之形式提供，即，於動物及／或人體之外。

【0131】 若無另外定義，此處所述之骨調素、Opn、flOpn、MmpOpn 及 ThrOpn，係分別指人類骨調素、人類 Opn、人類 flOpn、人類 MmpOpn 及人類 ThrOpn。

【0132】 此處所述之賦型劑的定義係較載劑更廣，意即，載劑係為一種賦型劑，但並非反之亦然。

【0133】 此處所述之「治療 (treating)」係指治癒 (cure) 已經發生之一疾病或狀態，亦可以包含抑制，意即阻止一疾病情勢或一狀態之進程，以及改善，意即使一疾病復原。

【0134】 「預防」一詞意指完全或幾乎完全停止一疾病情勢或狀態發生於一病患或實驗對象，特別當該病患或實驗對象係傾向於患上一疾病情勢或狀態之風險。

【0135】 此處所述「高度可變區域」或「HVR」係指一抗體變異域中之下述各區域，其係為序列高度可變者（互補性決定區或 CDR）及／或形成結構定義之環形（高度可變環形，hypervariable loop）及／或包含抗原接觸殘基（抗原接點，antigen contact）。一般而言，抗體包含六個 HVR：其中三個位於 V_H （H1、H2、H3），三個位於 V_L （L1、L2、L3）。HVR 之範例係於此處揭露。

【0136】 於此，「Ab」一詞係指抗體，且「mAb」一詞係指單株抗體。

【0137】 此處所述「單株抗體」一詞係指係指一抗體，該抗體係自大致上同種抗體 (substantially homogeneous antibodies) 之一族群所取得，即，除了可能的變異抗體（即，包含自然產生之突變或於生產一單株抗體製劑的過程產生之突變的抗體，這樣的變異體通常係以較少數量出現）以外，包含該族群之個別抗體皆相同及／或結合於相同之抗原表位。相較於典型的多株抗體製劑（包含不同之抗體且抗不同之決定位（抗原表位）），單株抗體製劑的各單株抗體係對抗一抗原之一單一決定位。因此，修飾詞「單株」係指該抗體之特性為獲取自一大致上同種之族群的抗體，且不解釋為限制該抗體必須藉由任何特定方法產生。舉例而言，本發明所使用之抗體可以透過許多種技術製得，包含但不限於雜交瘤方法、重組 DNA 方法，噬

菌體、酵母菌或哺乳動物細胞呈現方法，以及使用包含全部或部分人類免疫球蛋白位點之基因轉殖動物的方法，上述之方法及其他製作單株抗體的方法範例係於此詳述。

【0138】 本發明所述之「藥學製劑 (pharmaceutical preparation)」及「藥理學組合物 (pharmacological composition)」可以互相交換使用，且係指一組合物，其係用以並合適於投予人類個體。所述製劑或組合物係依據 GMP (優良製程, good manufacturing practices) 所製作，並充分地滅菌及包裝，以符合 EMA 及 FDA 所制定之要求，特別是 EMA。

【0139】 本發明係更進一步詳述於後續之實施方式及圖式之中，但不以此為限。

【圖式簡單說明】

【0140】

第 1 圖：疫苗誘發之血清抗全長 Opn (flOpn)、經凝血酶切割之 Opn (ThrOpn) 或經基質金屬蛋白酶切割之 Opn (MmpOpn) 的免疫反應性，係以 ELISA 測試之。(A) 包含如 SEQ ID NO: 1~5 所示之胜肽序列的疫苗，可以顯著地誘發抗 ThrOpn 之血清。(B) 包含如 SEQ ID NO: 6~9 所示之胜肽序列的疫苗，可以顯著地誘發結合至 MmpOpn 的血清。雖然如 SEQ ID NO: 10 所示之胜肽序列的末端與如 SEQ ID NO: 6~9 所示之胜肽序列具有相同的胺基酸，且皆顯示 Mmp 之切割位，惟包含如 SEQ ID NO: 10 所示之胜肽序列的疫苗所誘發之血清，係能夠辨識所有測試之 Opn 變異體。(C) 包含如 SEQ ID NO: 11~14 所示之胜肽序列的疫苗所誘發之血清，係能夠結合所有測試之 Opn 變異體。

第 2 圖：疫苗所誘發之抗體的功能活性測試結果。(A) 全長 Opn 所引發的細胞附著可以被血清所阻斷，所述血清係由包含如 SEQ ID NO: 12 或 14 所示之胜肽序列的疫苗所誘發，且所述血清係能夠結合至包含 flOpn

之所有 Opn 變異體。所有其餘血清則未顯示如此之抑制潛力。由 ThrOpn (B) 或 MmpOpn (C) 所誘發之細胞附著可以分別藉由對於 ThrOpn 具有專一性之血清 (如 SEQ ID NO: 1 或 2 所示之胜肽序列所誘發) 或對於 MmpOpn 具有專一性之血清 (如 SEQ ID NO: 7 或 8 所示之胜肽序列所誘發) 所阻斷, 或藉由包含如 SEQ ID NO: 12 或 14 所示之胜肽序列的疫苗所誘發且對於所有測試之 Opn 變異體具有全反應性之血清所阻斷。控制組之血清在各實驗中皆未顯示任何對於細胞附著之影響。

第 3 圖: mAb 抗全長 Opn (flOpn)、經凝血酶切割之 Opn (ThrOpn) 或經基質金屬蛋白酶切割之 Opn (MmpOpn) 的免疫反應性, 係以 ELISA 測試之。(A) mAb 4-4-2 與 ThrOpn 專一結合。(B) 及 (C) mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 對於 ThrOpn 有較小的交叉反應性, 但對於 MmpOpn 高度反應。(D) mAb 21-5-4 結合至所有形式之 Opn, 但對於經切割之 Opn 變異體反應性較高。

第 4 圖: 以西方墨點法分析 mAb 的免疫反應性, 其係抗 flOpn (第 1 ~ 4 行)、ThrOpn (第 5 及 6 行) 或 MmpOpn (第 7 及 8 行)。(A) mAb 4-4-2 顯示對於 ThrOpn 之微弱但具有專一性之結合。(B) 及 (C) mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 顯示結合至經切割之二種形式的 Opn, 但明顯對於 MmpOpn 的反應性較高。(D) mAb 21-5-4 結合至所有形式之 Opn, 但對於經切割之 Opn 變異體反應性較高。(E) 顯示所使用之標記。(F) 裝填情形之列表。

第 5 圖: mAb 之功能活性測試結果。(A) ThrOpn 所引發的細胞附著可以被 mAb 21-5-4 所阻斷, mAb 4-4-2 雖然對 ThrOpn 具有專一性, 但於本實驗中並未顯示具有抑制能力。(B) MmpOpn 所誘發之細胞附著可以藉由對 MmpOpn 反應性較高之 mAb 所阻斷, 例如 mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1, 或被全反應性之 mAb 21-5-4 所阻斷。

第 6 圖: 人類脂肪組織 (adipose tissue, 簡稱 AT) 之中, 經切割之

Opn 的測定。(A) 皮下 AT 溶解產物 (lysate) 經由 mAb 9-3-1 進行免疫染色。(B) 所有瘦 (n=6) 及肥胖 (n=6) 之樣品, 各樣品中 25kD 之條帶相對於 b-肌動蛋白 (b-actin) 的定量結果。此圖式顯示平均值 + / - 標準誤差 (standard error, 簡稱 SE)。**表示 $p < 0.01$ (Student's *T*-Test)

第 7 圖: mAb 4-4-2 的 CDR 環形之定序結果, 以圖像表示之。(A) V_H 區域之 CDR 環形 (B) V_L 區域之 CDR 環形。表示方式 / IMGT 編號系統係依據 Lefranc 等人所發表之文獻 (Lefranc et al., *Nucleic Acids Research* 1999, PMID: 12477501)。藍色底色之圓形係為骨架 1~3 之疏水性 (非極性) 殘基, 其係位於抗體之主要疏水性位置。黃色底色之圓形係為脯胺酸殘基。方形係為 CDR 之起始及結束的關鍵殘基。該骨架中的紅色胺基酸係為結構性之保守胺基酸。

第 8 圖: mAb 7-5-4 (及相等之選殖株 mAb 9-3-1) 的 CDR 環形之定序結果, 以圖像表示之。(A) V_H 區域之 CDR 環形 (B) V_L 區域之 CDR 環形。表示方式 / IMGT 編號系統係依據 Lefranc 等人所發表之文獻 (Lefranc et al., *Nucleic Acids Research* 1999, PMID: 12477501)。藍色底色之圓形係為骨架 1~3 之疏水性 (非極性) 殘基, 其係位於抗體之主要疏水性位置。黃色底色之圓形係為脯胺酸殘基。方形係為 CDR 之起始及結束的關鍵殘基。該骨架中的紅色胺基酸係為結構性之保守胺基酸。

第 9 圖: mAb 21-5-4 的 CDR 環形之定序結果, 以圖像表示之。(A) V_H 區域之 CDR 環形 (B) V_L 區域之 CDR 環形。表示方式 / IMGT 編號系統係依據 Lefranc 等人所發表之文獻 (Lefranc et al., *Nucleic Acids Research* 1999, PMID: 12477501)。藍色底色之圓形係為骨架 1~3 之疏水性 (非極性) 殘基, 其係位於抗體之主要疏水性位置。黃色底色之圓形係為脯胺酸殘基。方形係為 CDR 之起始及結束的關鍵殘基。該骨架中的紅色胺基酸係為結構性之保守胺基酸。

【實施方式】

【0141】 範例

【0142】 材料及方法

【0143】 主動接種方法 (active vaccination approach)

【0144】 雌性 BALB/c 小鼠(6~8 週)係以結合 KLH 之胜肽疫苗(200 μ l, 大致於 pH 7.4 之磷酸緩衝溶液中, 以氫氧化鋁作為佐劑), 進行首次接種, 並於雙週間隔下共接種四次, 其中每次實驗係對六隻小鼠分別接種該結合 KLH 之胜肽疫苗, 並重覆實驗, 實驗結果係呈現如後。小鼠血清之抗體滴定量係以酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 簡稱 ELISA) 進行, 滴定量則係以達到半數最大結合 (half-maximal binding, 意即 ODmax/2) 之血清稀釋量計算, 並呈現每組五或六隻小鼠的中位滴定量 (median titer)。所誘發之抗體的功能活性則以葡萄糖苷酸酶酵素釋放分析 (glucuronidase enzyme release assay) 測定。

【0145】 單株抗體製作

【0146】 用以產生免疫反應之抗原

【0147】 針對小鼠注射結合體 (conjugate), 該結合體係由連結至載劑蛋白 KLH (購自 MP Biomedicals) 之胜肽所組成, 該胜肽係透過包含一順丁烯二醯亞胺基團之一連接片段 (N-甲基吡咯烷酮, N-Methylpyrrolidon, 簡稱 NMP) 以連接至 KLH。本發明使用三種不同的胜肽, 其分別具有如 SEQ ID No: 2 所示之序列 (SVVYGLR-COOH)、具有如 SEQ ID No: 7 所示之序列 (GDSVVYG-COOH) 及具有如 SEQ ID No: 12 所示之序列 (C-TYDGRGDSVVYG-CO-NH₂)。序列 C-SVVYGLR-COOH 係用以誘發及最終製造專一性針對 ThrOpn 之抗體, 序列 C-GDSVVYG-COOH 則用以製造專一結合 MmpOpn 之抗體。相對地, 序列 C-TYDGRGDSVVYG-CO-NH₂ 係用以進行免疫反應, 誘發結合至

RGDSVVYG 模體之抗體，因而產生同時對於 ThrOpn 及 MmpOpn 皆具有專一性之抗體。

【0148】 將該連接片段結合至該 N 端半胱胺酸之 SH-基團，以生成該胜肽之結合體，其係為二步驟製程。首先，KLH 係經順丁烯二醯化 (maleylated)；將 1 mg 之連接片段 (50 mg/ml NMP) 添加至 1 ml 之 KLH 溶液 (10 mg/ml，於 pH 8.3 之 NaHCO₃ 中)，並於室溫下培養 1 小時。然後，以經 PBS 平衡之 Sephadex G50 管柱 (1.5 × 14 cm) 去除該 KLH-連接片段溶液中的鹽分。在第二步驟中，將經順丁烯二醯化之 KLH 結合至該胜肽；100 μl 之胜肽溶液 (10 mg/ml，於 bidest 水溶液中) 係與 1ml 經順丁烯二醯化之 KLH 溶液 (2 mg/ml，於 PBS 中) 混合，並於室溫下培養 2 小時。為阻斷未反應之順丁烯二醯亞胺，係將 2-巰基乙醇 (2-mercaptoethanol) 加入至溶液中 (至達到 10 nM 之濃度)，並於 4°C 下放置隔夜。該結合體續於 4°C 下針對 PBS 進行透析 (緩衝液更換三次，係以分子量 10,000 區分)。

【0149】 用以進行分析之抗原

【0150】 在小鼠血清及雜交瘤之上清液中，為排除對於 NMP 及 KLH 之專一性抗體，用於進行各 ELISA 分析 (請見下述「免疫反應」及「脾細胞與骨髓癌細胞之融合」) 之胜肽，係使用一特定之連接片段-載劑蛋白結合物，並依據如前所述之流程而使用之。其中該連接片段係為琥珀醯亞胺-6-[(β-順丁烯二醯亞胺丙醯胺基)己酸鹽] (Succinimidyl-6-[(β-maleimidopropioamido) hexanoat]，簡稱 SMPH，購自 Sigma)，該載劑蛋白係為 BSA (購自 Sigma)。

【0151】 免疫反應

【0152】 八週大之雌性 BALB/c 小鼠 (購自 Janvier，法國) 係經由腹膜內投予該結合體以產生免疫反應，持續時間為 39 天。收集免疫反應時間內之血清樣品，並以 ELISA 測試，作為成功誘發抗體之控制組。

【0153】 脾細胞與骨髓癌細胞之融合

【0154】 能夠生產抗所述三種骨調素胜肽之抗體的雜交瘤，係藉由將脾細胞與骨髓癌細胞融合而製得，其流程係如下述。一般而言，細胞係培養於 DMEM 培養基 (complete DMEM, 購自 PAN Biotech)，並添加抗生素 (10000 L.E 盤尼西林, 10000 $\mu\text{g/ml}$ 鏈黴素, 25 $\mu\text{g/ml}$ 兩性黴素, 100x, 購自 PAA)、2-巯基乙醇 (購自 Sigma)、L-穀氨醯胺 (100x, 購自 PAA)、穩定之穀氨醯胺 (100x, 購自 PAA)、HT 添加物 (HT-supplement, 50x, 購自 GIBCO/BRL)、MEM 非必需胺基酸 (100x, 購自 PAA), 以及 10、15 或 20% 之 FCS (購自 PAA)。取出經免疫反應之小鼠的脾臟，並藉由均質器 (homogenizer) 或細胞過濾器 (cell strainer) 製成一單細胞懸浮液。骨癌細胞株 SP2/0-Ag14 (SP2/0) 係購自德國微生物菌種保存中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 簡稱 DSMZ), 並培養於 DMEM 培養基 (complete DMEM, 10%FCS) 中，定期進行類菌載體 (mycoplasma) 污染之篩檢。該脾細胞及該骨癌細胞株 SP2/0 係以 DMEM 清洗，並以聚乙二醇 3350 (polyethylenglycol 3350, 1 ml 50% w/v, 購自 Sigma) 進行融合。所生成之雜交瘤係重新分散於 DMEM 培養基 (complete DMEM, 20% FCS) 及氨基蝶呤 (Aminopterin, 50x, 購自 Sigma) 中 (HAT 培養基)，並接種至 96 孔組織培養盤 (購自 Corning Costar) 中之腹膜供給細胞 (peritoneal feeder cell)，該雜交瘤係於 37°C 及 5% 二氧化碳之環境下培養 10 天。

【0155】 用以篩選小鼠血清及雜交瘤上清液之 ELISA

【0156】 將溶於 pH 9.6 100 mM NaHCO_3 之胜肽-BSA 結合體 (請見下表) 塗覆 (coat) 於 ELISA 盤 (ELISA plate, 購自 PAA, Cat# PAA38096X), 續以 TBS (10 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.8) 及 0.01% Triton X-100 清洗 ELISA 盤，並以包含 2% FCS (v/v) 之 TBS 進行阻斷。雜交瘤上清液 (未

經稀釋)及血清(1:100)係稀釋於阻斷溶液中，並添加於經塗佈之 ELISA 盤的表面，以 SP2/0 之細胞上清液作為負控制組。續清洗 ELISA 盤，並以結合 AP 之山羊抗小鼠 IgG 抗體(goat anti-mouse IgG antibody, 購自 Sigma)偵測已結合之抗體，其中係以 4-硝基苯磷酸鹽(4-Nitrophenylphosphat 2 mM, 於包含 1 mM MgCl₂ 之 5% 二乙醇胺中，購自 Fluka)作為鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase, 簡稱 AP)之受質。以微盤讀取器(microplate reader, 購自 Dynex Opsys MR)讀取 405 nm 之吸光值，小鼠血清之抗體滴定量係以血清滴定檢測之。為篩選雜交瘤上清液，當一選殖株於 405 nm 之吸光值訊號為 ELISA 盤之平均值的兩倍以上時，認定該選殖株為陽性。

【0157】 下述之胜肽係經合成，具有一半胱胺酸殘基添加於該 N 端，以供連結之用：

用以進行免疫反應之胜肽(與 KLH 結合)	用以進行 ELISA 以篩檢血清及雜交瘤上清液之免疫反應性的胜肽(與 BSA 結合)
C-SVVYGLR-COOH (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列)	C-SVVYGLR-COOH (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) C-VYGLRSK-COOH (如 SEQ ID NO: 51 所示之序列) C-GDSVVY G-COOH (如 SEQ ID NO: 7 所示之序列)
C-GDSVVY G-COOH (如 SEQ ID NO: 7 所示之序列)	C-GDSVVY G-COOH (如 SEQ ID NO: 7 所示之序列) C-SVVYGLR-COOH (如 SEQ ID NO: 2 所示之序列) C-YDGRGDS-COOH (如 SEQ ID

	NO : 52 所示之序列)
C-TYDGRGDSVVYG-CO-NH ₂ (如 SEQ ID NO : 12 所示之序列)	C-TYDGRGDSVVYG-CO-NH ₂ (如 SEQ ID NO : 12 所示之序列) C-TYDGAAASVVYG-CO-NH ₂ (如 SEQ ID NO : 53 所示之序列) C-TAAARGDAAAYG-CO-NH ₂ (如 SEQ ID NO : 54 所示之序列)

【0158】 製造抗體之選殖株 (antibody-producing clone) 的選擇階段 (selection phase)

【0159】 將經 ELISA 檢測呈陽性之細胞轉移至一 48 孔盤中，並培養數天。於此時間段中，該上清液再次經 ELISA 檢測，以測定該上清液對應相關胜肽之反應性。所述選擇階段較短，以避免不具專一性之選殖株過度生長。

【0160】 選殖 (cloning)

【0161】 於該選擇階段之後，進行初次選殖，其目的係為將可以製造抗體之細胞與無法用以製造抗體之細胞 (non-producing cells) 分離，而二次選殖則係確認所選擇之選殖株係為單株。於上述二者之中，係藉由受限制之稀釋及將細胞轉移至一 24 孔盤，以進行選殖。於 6~8 天後，以顯微鏡觀察單株細胞之生長，續於 3 天後，以 ELISA 分析其上清液，並選擇顯示最佳生長狀態及 ELISA 訊號之次選殖株 (subclone)，以進行該二次選殖步驟，同時進一步進行低溫保存。該次選殖株之上清液需進行類菌載體污染的測試 (購自 Greiner Bio-One，弗里肯豪森，德國)，且應使用商業上可取得之套組 (購自 Serotec) 以測定該單株抗體之同型。

【0162】 單株抗體之定序

【0163】 單株抗體之定序係由 Fusion Antibodies Ltd (Springbank

Industrial Estate, Pembroke Loop Road, 貝爾法斯特, 北愛爾蘭, BT17 0QL) 進行。

【0164】 mRNA 係萃取自 10/10/13 之雜交瘤細胞沉澱物 (pellet), 其中係依循 Fusion Antibodies Ltd 之機構內 RNA 萃取流程 (in-house RNA extraction protocol), 以自該沉澱物萃取總 RNA。

【0165】 RT-PCR

【0166】 使用 dT 寡聚物引子 (oligo(dT) primer) 對該 RNA 進行反轉錄, 以製作 cDNA。該 cDNA 係經 S.N.A.P 純化, 並使用 5' RACE 套組以 TdT 對 cDNA 進行加尾 (tailing)。使用 AAP 及可變域之反向引子進行 PCR 反應, 以擴增該單株抗體 DNA 的 V_H 及 V_L 區域。

【0167】 將該 V_H 及 V_L 產物選殖至 Invitrogen 定序載體 pCR2.1 中, 並轉型進入 TOP10 細胞, 續以 PCR 篩選陽性轉型株。挑出選定之菌落, 並以 ABI3130xl Genetic Analyzer 進行 DNA 定序分析, 結果係呈現如後:

【0168】 重組人類 Opn 蛋白之選殖、產生及製造

【0169】 包含指定標記 (Strep、6xHis) 之三種 Opn 的重組型式, 係經表現及純化:

- a) Strep – 314 AA (全長 Opn) – 6xHis;
- b) 6xHis – 166AA (N 端經 MMP 切割之 Opn);
- c) 6xHis – 168AA (N 端經凝血酶切割之 Opn)。

【0170】 cDNA 選殖株 BC017387 (購自 Thermo Scientific) 係用以作為一模板。

【0171】 以 相 同 之 正 向 引 子 (5'-AGCGGCTCTTCAATGATACCAGTTAAACAGGCTGATTC-3'; 如 SEQ ID NO:42 所示之序列) 及下列反向引子進行該 DNA 序列之擴增: (a) Strep – 314 AA (5'-AGCGGCTCTTCTCCCATTGACCTCAGAAGATGCACT-3'; 如

SEQ ID NO : 43 所示之序列) ; (b) 6xHis - 166 AA (5'-AGCGGCTCTTCTCCCCTATCCATAAACCACACTATCACC-3' ; 如 SEQ ID NO : 44 所示之序列, 於單獨 N 端標記之形式中, 包含第 166 個胺基酸以後之停止密碼子) ; (c) 6xHis - 168 AA (5'-AGCGGCTCTTCTCCCCTACCTCAGTCCATAAACCACAC-3' ; 如 SEQ ID NO: 45 所示之序列) (於單獨 N 端標記之形式中, 包含第 168 個胺基酸以後之停止密碼子)。

【0172】 使用 StarGate Entry Cloning 系統 (購自 IBA, Göttingen) 將該擴增產物選殖至 pENTRY-IBA51 質體中, 續次選殖進入 pCSG-IBA142 質體或 pCSG-IBA144 質體 (皆購自 IBA) 中, 依照廠商提供之用法說明分別將一 N 端 6x 組胺酸標記、一 N 端 OneStrep®標記或一 C 端 6x 組胺酸標記引入質體中。

【0173】 以 Lipofectamine 2000 (購自 Life Technologies, Carlsbad) 對 HEK293 c18 細胞株 (購自 ATCC, CRL-10852) 進行轉染, 以誘發短暫表現 (transient expression), 續以 Ni-NTA 樹脂 (購自 Merck, Darmstadt) 或 Strep-Tactin (購自 IBA, Göttingen) 裝填之重力引流管柱 (gravity flow column) 進行純化。純化之蛋白續經十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳 (sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 簡稱 SDS-PAGE) 分析, 以及針對 PBS 進行透析。

【0174】 以 ELISA 測定單株抗體與重組 Opn 蛋白的交叉反應性

【0175】 以 1 µg/ml 重組人類 Opn 蛋白 (自行製作或購自 Pepro Tech, Cat# 120-35, 作為對照組) 塗覆 ELISA 盤 (購自 Nunc, Cat# 439454), 該重組人類 Opn 蛋白係溶於 pH=9.2 之 100mM NaHCO₃, 續以包含 1% BSA 之 1x PBS 進行阻斷。以結合 HRP 之山羊抗小鼠 IgG 抗體 (購自 Jackson Laboratory, Cat# 115-035-068, 0.2 µg/ml) 偵測已結合之小鼠抗人類單株

抗體 (mouse anti-human monoclonal antibody, 購自 BioGenes, 1 $\mu\text{g/ml}$), 以及作為正控制組之小鼠血清。ABTS (包含 0.68 mM ABTS 之 0.1 M 檸檬酸, pH=4.3) 及 0.1% 過氧化氫係作為辣根過氧化酶 (horse radish peroxidase, 簡稱 HRP) 之受質。於孔中添加 1% SDS 以停止受質反應, 並以微盤讀取器 (購自 TECAN Sunrise) 讀取 405 nm 之吸光值。

【0176】 膠體電泳及西方墨點法

【0177】 使用 4~20% Criterion TDX 預鑄膠 (precast gel, 購自 BioRad, Cat# 567-1095) 進行膠體電泳, 重組人類 Opn 蛋白 (自行製作或購自 Pepro Tech, Cat# 120-35) 係於非還原性上樣緩衝液 (reducing loading buffer, 包含 4x LDS 緩衝液, 購自 Invitrogen, Cat# NP0007, 並添加 0.1% (v/v) β -巰基乙醇) 之中進行變性 (70°C、10 分鐘)。每個樣品井裝填的蛋白量係為 0.6 μg , 並以 Precision Plus Protein Dual (購自 Biorad, Cat#161-0374) 作為蛋白分子量標準梯度 (protein ladder), 使用 1x Tris/Glycin/SDS 緩衝液作為跑膠緩衝液 (running buffer, 購自 Biorad, Cat# 161-0732)。使用 Transfer Turbo 墨點轉印套組 (購自 Biorad, Cat# 170-4159) 將該蛋白轉印至一 0.2 μm 硝化纖維素薄膜, 並以商業可取得之阻斷液 (購自 Thermo scientific, #37515) 對該薄膜進行阻斷。抗體係稀釋於 1:10 之阻斷液中, 首先將薄膜置於小鼠抗人類單株抗體 (購自 BioGenes, 1 $\mu\text{g/ml}$) 中浸泡 1 小時, 並以 0.1% PBST 清洗。為進行檢測, 以一結合 HRP 之 IgG 抗體 (購自 Southern Biotech, Cat# 1034-05, 1:40,000) 浸泡 45 分鐘, 續以清洗緩衝液 (washing buffer) 以及 dH₂O 清洗薄膜。最後將薄膜於受質 (購自 ECL Clarity Western, Biorad #170-5061) 中浸泡 5 分鐘, 使用 LabWorks software 4.6 以獲取影像。

【0178】 功能性分析 (functional array) – 附著分析 (adhesion array)

【0179】 將 0、10 或 30 nM 之重組人類 Opn 蛋白塗佈於具有 V 形底

部之微盤（購自 Greiner，Cat# 651161）（1 小時，37°C），並以 1% BSA / 1x PBS 進行阻斷（1 小時，37°C）。以 1x PBS 清洗後，於孔中加入 5 µg/ml 阻斷抗體（37°C 下 1 小時），其為小鼠抗人類單株抗體（購自 BioGenes）及一 IgG1 同型控制組（購自 Sigma，Cat# M9269）。而後，清洗微盤，並於孔中添加 20,000 顆事先處理帶有 CMFDA 標籤之 HEK293 細胞（30 分鐘，37°C）。不久後，以 0.02% EDTA（Versene，購自 GIBCO，Cat# 15040）收下 HEK293 細胞，並重新分散於不含酚紅（phenol red）之 DMEM 中（購自 Sigma，Cat# D5921，添加 10% FCS、1% 盤尼西林 / 鏈黴素（購自 GIBCO，Cat# 15140）及 4 mM L-穀氨醯胺（購自 GIBCO，Cat# 25030））。於 HEK293 細胞中添加 1.5 µM CMFDA 活細胞染色劑（cell tracker，購自 Molecular Probes，Cat# C7025），以對 HEK293 細胞進行標籤化（30 分鐘，37°C，500rpm），以不含酚紅之 DMEM 清洗細胞兩次，續將細胞加入孔中。於微盤中培養該細胞之後，將微盤於 100 g 下離心 5 分鐘，未附著之細胞會移動至該 V 形孔的底部，即可以透過底部讀取（Genios 微盤讀取器，激發 485 nm，發射 535 nm）測量螢光強度以進行定量。

【0180】 表面電漿共振（Surface Plasmon Resonance，簡稱 SPR）

【0181】 係以 Biacore 2000 進行結合之分析，代表不同 Opn 產物之不同的生物素化胜肽配體係分別固定於一流路（flow cell）中的一鏈黴卵白素晶片（streptavidin chip）上，流速係為 30 µl/min，第四個流路則為不含胜肽之參考流路。所述胜肽係溶於 DMSO 溶液中，並進一步稀釋於 HBS 緩衝液（0.01M HEPES、0.1M NaCl、0.004M EDTA、0.05% P20，pH 7.4）之中。於固定步驟之後，以 1 µM D-生物素（D-Biotin）充滿各流路，並以一非專一性血清注入各流路以作為控制組。該抗體之流速為 30 µl/min，濃度為 2 µg/ml，注入體積為 100µl，解離時間係設定為 500 秒。係以 60 µl 之 50 mM HCl 使該晶片再生，以 Biacore SPR 軟體計算解離速率值及解離

常數值。

【0182】 利用本發明之 mAb 作為診斷工具，以測定人類樣品中 Opn 濃度（另請見範例 6）

【0183】 皮下脂肪組織（AT）切片係取自嚴重肥胖（ $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ）或年齡及性別配對之瘦至過重的控制組（ $BMI \leq 30$ ）非糖尿病患者〔空腹血糖 $< 126 \text{ mg/dL}$ ，以及於 75-g 口服葡萄糖耐受性測試（oral-glucose-tolerance test，簡稱 OGTT）後之 2-h 血糖 $< 200 \text{ mg/dL}$ 〕，前述患者之年齡介於 20~65 歲之間，曾進行過選擇性之肥胖治療或其他內視鏡腹部手術，並排除曾於過去兩週內發生急性疾病、已知患有糖尿病或使用降血糖藥物、後天性免疫不全（感染 HIV）、肝炎或其他顯著之肝臟疾病（significant liver disease）、嚴重或未經治療之心血管、腎臟、肺部疾病、未經治療或未妥善治療之臨床顯著甲狀腺疾病（clinically significant thyroid disease）、貧血、活化惡性疾病（active malignant disease）、先天或後天出血性疾病（bleeding disorder，包含殺鼠靈治療（warfarin treatment））、懷孕或哺乳之患者。

【0184】 將 50 mg 之冷凍 AT 溶解並均勻分布於 210 μl 之溶解緩衝液（lysing-buffer），該溶解緩衝液包含 20 mM Tris、140 mM NaCl、1% Triton-X、完整之蛋白酶抑制劑混合液（complete-protease inhibitor cocktail，購自 Roche）及鈎酸鈉（sodium-orthovanadate，1 mM），並調整至 pH 7.4。而後將樣品加入非還原性上樣緩衝液中，於 95°C 下加熱 10 分鐘，並於 10k U/min、4°C 下進行離心。取位於脂肪層之下的液相並重複離心之，續使用 600 nm 蛋白質分析套組（購自 Thermo Scientific）分析蛋白質濃度。各樣品取 10 μg 之蛋白，依照西方墨點法之標準流程，以 12% 之聚丙烯醯胺膠體進行 SDS-PAGE 分離，並轉染至一硝基纖維素薄膜；其中以 20 $\mu\text{g/ml}$ 之 mAb CMI 9-3 及結合 HRP 之山羊抗小鼠（購自 BioRad

#170-6516) 偵測 25kDa 之 Opn 片段，並以抗 b-肌動蛋白 (購自 Novus Biologicals #AC-15) 作為裝填控制組。使用 Fusion-FX 顯像儀器 (Fusion-FX imaging instrument, 購自 Peqlab) 及 ImageJ 軟體 (購自 U. S. National Institutes of Health), 以獲取墨點之圖像及定量條帶強度。

【0185】 主動接種

【0186】 範例 1: 誘發一抗體免疫反應，該抗體係專一地結合至經凝血酶切割或經 MMP-3、MMP-7、MMP-9 切割形式之 Opn；或者誘發一抗體免疫反應，該抗體係結合於 159RGD161 區域，即該隱蔽域，因此結合至任何形式之 Opn (全長、經凝血酶切割及經 MMP-3、MMP-7、MMP-9 切割之 Opn)。

【0187】 於本研究中，係以結合體疫苗使小鼠產生免疫反應，該結合體疫苗包含如第 2 表所示之抗原性胜肽的其中一者。本研究之目的係為篩選有能力誘發抗體反應的抗原性胜肽，該抗原性胜肽所誘發之抗體係專一結合至截斷形式之 Opn，即經凝血酶切割或經 MMP-3、MMP-7、MMP-9 切割形式之 Opn。此外，本研究之目的係為篩選有能力誘發抗體反應的抗原性胜肽，該抗原性胜肽所誘發之抗體係結合至該 159RGD161 模體，即該隱蔽域，因此對於 Opn 具有專一性，但無法辨別不同形式之 Opn (全長、經凝血酶切割及經 MMP-3、MMP-7、MMP-9 切割之 Opn)。

【0188】 為了篩選能夠誘發針對經凝血酶切割而產生之新抗原表位之抗體反應的胜肽，係使用長度不同之胜肽 (具有如 SEQ ID NOs: 1~5 所示之序列) 以誘發免疫反應。這些胜肽之 C 端皆以精胺酸 (R) 結尾，其係為凝血酶切割位置，且這些胜肽之 C 端未經醯胺化。

【0189】 為了篩選能夠誘發針對經 MMP-3、MMP-7、MMP-9 切割而產生之新抗原表位之抗體反應的胜肽，係使用長度不同之胜肽 (具有如 SEQ ID NOs: 6~10 所示之序列) 以誘發免疫反應。這些胜肽之 C 端結尾皆以

甘胺酸（G）結尾，其係為 MMP 切割位置，且這些胜肽之 C 端未經醯胺化。

【0190】 爲了篩選能夠誘發一抗體反應之胜肽，其所誘發之抗體係針對 Opm 之 RGD 區域（位於 159~161 位置），即 Opm 之側面的（flanking）胺基酸（包含該隱蔽域），係使用具有如 SEQ ID NOs：11~14 所示之序列的胜肽以誘發免疫反應。這些胜肽係經過設計，而使得用於誘發免疫反應之該抗原性胜肽勝過該 RGD 片段。這些胜肽之 C 端係經醯胺化，以引導該抗體對於該胜肽之更中間的部份產生反應。

【0191】 第 1 表：本發明用於一活化胜肽基礎（active peptide-base）結合體疫苗所使用之 Opm 的胜肽序列，藉此誘發針對 Opm 的一抗體免疫反應；其中，具有如 SEQ ID NOs：1~10 所示之序列的胜肽，係具有一自由羧基末端（free carboxyl end, COO⁻）；而具有如 SEQ ID NOs：11~14 所示之序列的胜肽，則較佳係經醯胺化（COO-NH₂）（且於此處所述之實驗中係經醯胺化）

序列識別編號	Opm 的胺基酸位置	序列
SEQ ID No：1	163~168	VVYGLR
SEQ ID No：2	162~168	SVVYGLR
SEQ ID No：3	161~168	DSVVYGLR
SEQ ID No：4	159~168	RGDSVVYGLR
SEQ ID No：5	157~168	DGRGDSVVYGLR
SEQ ID No：6	161~166	DSVVYG
SEQ ID No：7	160~166	GDSVVYG
SEQ ID No：8	159~166	RGDSVVYG
SEQ ID No：9	157~166	DGRGDSVVYG

SEQ ID No : 10	155~166	TYDGRGDSVVYG
SEQ ID No : 11	157~168	DGRGDSVVYGLR
SEQ ID No : 12	155~166	TYDGRGDSVVYG
SEQ ID No : 13	153~164	VDTYDGRGDSVV
SEQ ID No : 14	151~162	PTVDTYDGRGDS

【0192】 以指定之胜肽誘發小鼠的免疫反應，並測定所誘發之抗體對於重組製造之不同形式之 Opn (全長 { flOpn }、具有凝血酶切割位置之截斷 Opn 1-Opn-168 { ThrOpn }、具有 MMP 切割位置之截斷 Opn 1-Opn-166 { MmpOpn }) 的中位滴定量，如第 1 圖所示。儘管所有測試之胜肽皆能夠誘發抗體，且誘發之抗體係以相同強度結合至所注射之胜肽 (資料未顯示)，但這些抗體所誘發之血清針對 flOpn、ThrOpn 及 MmpOpn 的反應性差距甚大。

【0193】 令人驚訝地，具有如 SEQ ID NO : 1 所示之序列的胜肽 (雖然其免疫反應之強度低於具有如 SEQ ID NO : 1 或 SEQ ID NO : 2 所示之序列的胜肽)、具有如 SEQ ID NO : 2 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO : 3 所示之序列的胜肽，其所誘發之反應幾乎僅針對經凝血酶切割形式之 Opn 具有專一性。然而，具有如 SEQ ID NO : 4 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO : 5 所示之序列的胜肽，其所誘發之抗體則也會結合至 MmpOpn。

【0194】 相對地，具有如 SEQ ID NO : 6 所示之序列的胜肽、具有如 SEQ ID NO : 7 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO : 8 所示之序列的胜肽，其所誘發之抗體反應係針對經 MMP 切割形式之 Opn，並具有高度專一性及高強度 (第 1 圖 (B))，與分析其他蛋白所誘發之血清的情形不同。

【0195】 有趣的是，具有如 SEQ ID NO : 10 所示之序列的胜肽、具有如 SEQ ID NO : 12 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO : 14 所示之

序列的胜肽，其所誘發之血清會針對所有形式之 Opn 發生反應（第 1 圖（C））。需特別注意，所誘發之血清對於 Opn 具有專一性，因此抗體之結合需要胺基酸序列 159RGD161，即 Opn 之側面的特異性胺基酸（flanking Opn specific amino acid）。

【0196】 另請注意，用於作為控制組之疫苗，其不會誘發結合至任何所述形式之 Opn 的抗體反應（資料未顯示）。

【0197】 範例 2：疫苗誘發之免疫血清的功能評估

【0198】 為評估疫苗誘發之血清（如範例 1 所述）用於阻斷不同形式 Opn（全長、經凝血酶切割或經 MMP 切割之 Opn）之活性的潛力，遂進行如材料及方法段落所詳述之功能性附著分析。簡略言之，係以重組製造之全長 Opn、末端具有凝血酶切割位置之 Opn（ThrOpn 或 1-Opn-168）及末端具有 MMP-3、MMP-7、MMP-9 切割位置之 Opn（MmpOpn 或 1-Opn-166）分別塗覆 96 孔盤。而後，將如範例 1 所述來自經免疫反應之動物的血清以及帶有一螢光染劑標籤之 HEK293 細胞加入盤中，依照材料及方法段落之描述測定及計算附著率。

【0199】 如第 2 圖所示，經具有如 SEQ ID NO：1 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO：2 所示之序列的胜肽誘發之血清，其針對經凝血酶切割形式之 Opn 具有專一性（第 1 圖（A）），僅能夠阻斷 HEK293 細胞附著至 ThrOpn（第 2 圖（B）），但不影響 HEK293 附著至其他形式之 Opn（第 2 圖（A）及第 2 圖（C）），證實具有如 SEQ ID NO：1 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO：2 所示之序列的胜肽可以誘發血清產生專一性。更重要地，加入經具有如 SEQ ID NO：1 所示之序列的胜肽誘發之血清時，其對於 HEK293 附著至塗覆有 ThrOpn 之盤上的抑制程度低於經具有如 SEQ ID NO：2 所示之序列的胜肽誘發之血清，此結果與經誘發之血清針對 ThrOpn 的反應性相符（第 1 圖（A））。

【0200】 相對於如 SEQ ID NO：1 所示之序列及如 SEQ ID NO：2 所示之序列，誘發之血清針對 MmpOpn 具有專一性（第 1 圖（B））的胜肽（具有如 SEQ ID NO：7 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO：8 所示之序列的胜肽）僅可以阻斷 HEK293 細胞附著至塗覆有末端為 MMP 切割位置之截斷 Opn（MmpOpn）的盤上（第 2 圖（C）），此結果同樣證實了誘發之血清針對 MmpOpn 的反應性。

【0201】 誘發之血清會結合所有形式之 Opn（第 1 圖）的胜肽（具有如 SEQ ID NO：12 所示之序列的胜肽及具有如 SEQ ID NO：14 所示之序列的胜肽）能夠阻斷 HEK293 細胞附著至所有不同形式之 Opn（第 2 圖（A）～（C）），再次證實其全反應性。

【0202】 非相關（irrelevant）之胜肽序列（控制組序列 1 及 2）所誘發之血清係作為控制組，如預期地，這些血清不會影響 HEK293 細胞附著至各種形式之 Opn。

【0203】 單株抗體之產生以及所述 mAb 之評估

【0204】 範例 3：單株抗體之產生及純化，以及以 ELISA 及西方墨點法測定所述單株抗體針對不同 Opn 產物之結合特性

【0205】 為了產生對於不同 Opn 產物（全長、ThrOpn 及 MmpOpn）具有專一性，進而能夠辨別不同 Opn 產物之 mAbs，係以不同胜肽序列使小鼠產生免疫反應，誘發具專一性抗體反應（第 1 及 2 圖）。

【0206】 如第 2 表所示，為了產生專一性結合至經凝血酶切割之 Opn 產物的抗體，係使用具有如 SEQ ID NO：2 所示之序列的胜肽以進行免疫反應。為了產生專一性結合至經 MMP 切割之 Opn 產物的抗體，係使用具有如 SEQ ID NO：7 所示之序列的胜肽以進行免疫反應，另為了產生結合至所有 Opn 產物（無論全長或經切割）的抗體，係使用具有如 SEQ ID NO：12 所示之序列的胜肽以進行免疫反應。

【0207】 依照材料及方法段落之描述，進行製造單株抗體之雜交瘤細胞株的產生、選擇及純化。自大量的製造 mAb 之雜交瘤細胞株中，審慎地篩選及分析，最後選取四株不同的製造抗體之雜交瘤細胞株，如第 2 表所示。使用蛋白 A 管柱 (protein A column) 進行親和力純化，以自細胞培養之上清液中純化 mAb，並分析其特性及分類如第 2 表所示。

【0208】 第 2 表：所述單株抗體之特性

選殖株名稱	用以進行免疫反應之胜肽	重鏈同型	輕鏈同型
4-4-2	如 SEQ ID No : 2 所示之序列 SVVYGLR-COOH 對於凝血酶切割位置具有專一性	IgG ₁	κ
7-5-4	如 SEQ ID No : 7 所示之序列 GDSVVYG-COOH 對於 MMP 切割位置具有專一性	IgG ₁	κ
9-3-1	如 SEQ ID No : 7 所示之序列 GDSVVYG-COOH 對於 MMP 切割位置具有專一性	IgG ₁	κ
21-5-4	如 SEQ ID No : 12 所示之序列 TYDGRGDSVVYG-CO-NH ₂ 即 Opn 之 RGD 位置	IgG ₁	κ

【0209】 爲了更詳細分析 mAb 之特性及結合能力，遂進行 ELISA 研究及西方墨點法分析。

【0210】 首先，以 ELISA 測定不同 mAb 專一性辨識不同 Opn 產物(全長或經截斷之 Opn 片段) 的能力。

【0211】 測定個別單株抗體針對原生全長及經蛋白酶切割之 Opn 的專一性，結果係如第 3 圖所示。第 3 圖 (A) 顯示 mAb 4-4-2 專一性地與 ThrOpn 交互作用，而 mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 專一性地結合 MmpOpn (分別如第 3 圖 (B) 及 (C) 所示)。已知具有如 SEQ ID NO : 12 所示之序列的胜肽可以產生針對該 RGD 區域之抗體反應，所誘發之 mAb 21-5-4 的反

應性係如第 3 圖 (D) 所示，mAb 21-5-4 能夠結合所有 Opn 產物，惟其對於經切割之 Opn 的反應性較高。

【0212】 在後續的一組實驗中，係以西方墨點法分析不同 mAb 分別結合至經蛋白酶切割之 Opn 片段及／或全長 Opn 蛋白之能力 (第 4 圖)。mAb 4-4-2 對於 ThrOpn 的反應訊號強度較低 (第 4 圖 (A)，第 5 及 6 行)，而 mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 與 MmpOpn 之專一性反應則具有較高強度 (分別如第 4 圖 (B) 及 (C) 所示；第 7 及 8 行)。如同自 ELISA 數據之預期，mAb21-5-4 能夠對所有 Opn 形式進行染色 (第 4 圖 (D)；全長 Opn — 第 1~4 行，經蛋白酶切割之 Opn — 第 5~8 行)。同樣地，全長 Opn 所測得之西方墨點法的強度低於經切割之形式的 Opn 的強度。由於用於第 1~4 行之重組製造的全長 Opn 蛋白係包含不同的標記系統，這些蛋白之尺寸不同，故於膠體及／或墨點之結果中會出現於不同位置。第 4 圖 (E) 顯示用於這些實驗中的蛋白標記 M1 (marker M1)，而第 4 圖 (F) 顯示不同的 Opn 產物是如何使用於該膠體中的。

【0213】 範例 4：以附著分析對選定之 mAb 4-4-2、mAb 7-5-4、mAb 9-3-1 及 mAb 21-5-4 的進行功能性評估

【0214】 在後續的一組實驗中，係進一步以前述以細胞為基礎之分析 (cell-based assay) 測定分析所述抗體抑制 HEK293 細胞附著至各 Opn 片段的功能活性，並使用 ThrOpn 及 MmpOpn。第 5 圖 (A) 顯示單株抗體抑制 HEK293 細胞附著至經凝血酶切割之 Opn (ThrOpn) 的能力。雖然 mAb 4-4-2 曾顯示對於 ThrOpn 的專一性交互作用 (第 3 及 4 圖)，但在此功能性分析中，mAb 4-4-2 不具有阻斷 ThrOpn 的能力 (第 5 圖 (A))。在 ELISA 及西方墨點法中該抗體具有與 Opn 結合的能力，而在以細胞為基礎之分析中卻缺乏功能性活性，上述二者之間的矛盾，可以解釋為該抗體針對該標的蛋白 (第 4 表) 具有低親和力 (特別是高解離速率)。相對地，mAb 21-5-4

強烈地降低 HEK293 細胞與 ThrOpn 的結合。此外，mAb 21-5-4 亦能夠抑制 HEK 細胞與 MmpOpn 之結合（第 5 圖（B）），再次證實 mAb 21-5-4 對於不同 Opn 產物的全反應性。對於 MMP 切割位置具有專一性之 mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1，則僅抑制 MmpOpn 所誘發的 HEK293 細胞附著行為（第 5 圖（B）），亦證實由 ELISA 及西方墨點法所推導出之資訊，並證明其專一性。

【0215】 範例 5：以 SPR 測定 mAb 4-4-2、mAb 7-5-4、mAb 9-3-1 及 mAb 21-5-4 的親和力

【0216】 爲了定義所選取之 mAbs 對於各自對應標的之結合強度，遂使用代表不同 Opn 產物的胜肽進行 SPR 分析。mAb 4-4-2 對於 ThrOpn 具有 13.9 nM 之親和力，以及 $2.79 \text{ E-3 sec}^{-1}$ 的解離速率值（描述該抗體一標的的複合物形成後之穩定性）。較高的解離速率值，顯示該標的一抗體複合體之穩定性較弱。因此，在多次清洗之狀況下（例如於功能性以細胞爲基礎之附著分析中），該抗體會經清洗而離開其標的，推測上述即爲該抗體未於功能性分析之中表現對於 HEK293 附著抑制的原因。另一方面，mAb 4-4-2 具有中度至較佳之親和力（ K_d 13.9 nM），是以，此抗體具有較高的結合能力（on-rate capacity），所述之結合能力係表示此抗體辨認及結合其標的之能力及速度。於較接近生理之情況中，抗體之持久性不會受到消耗抗體之步驟的影響，故預期 mAb 4-4-2 亦能夠顯現其功能活性。

【0217】 mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 顯示幾乎相同之解離速率及 K_d 值。mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 的 K_d 值幾乎是最低的 nM 範圍，或甚至是高 pM 之範圍，表示二者之高度親和力。另外，mAb 21-5-4 則顯示優異的解離速率值，且 mAb 21-5-4 亦顯示對於該標的區域的高親和力。

【0218】 第 3 表：mAb 對於其標的之親和力測定結果

選殖株名稱	測試之 Opn 產物	解離速率值 (sec^{-1})	K_d 值 (nM)
-------	------------	-----------------------------	--------------

4-4-2	ThrOpn	2.79 E-3	13.9 E-9
7-5-4	MmpOpn	8.89 E-5	1.12 E-9
9-3-1	MmpOpn	8.79 E-5	0.97 E-9
21-5-4	ThrOpn 及 MmpOpn	1.00 E-5	0.84 E-9

【0219】 mAb 測試結果之摘要

【0220】 mAb 4-4-2 專一性地辨識 ThrOpn 之原生形式 (第 3 圖 (A)) 及變性形式 (第 4 圖 (A))。

【0221】 mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1 專一性地辨識 MmpOpn 之原生形式 (第 3 圖 (B) 及 (C)) 及變性形式 (第 4 圖 (B) 及 (C)) 且具有功能活性, 導致明確地抑制 MmpOpn 所誘發之 HEK293 細胞附著行為 (第 5 圖 (B))。

【0222】 mAb 21-5-4 辨識所有 Opn 片段之原生形式 (第 3 圖 (D)) 及變性形式 (第 4 圖 (D))。並且, mAb 21-5-4 係具有功能活性, 導致明確地抑制 MmpOpn、ThrOpn 及兩者共同誘發之 HEK293 細胞附著行為。

【0223】 範例 6: 本發明之 mAb 用於診斷之用途

【0224】 為測試 Opn 及 MMPs 基因表現量的上升是否表示 Opn 蛋白及 Opn 片段在人類 AT 中的含量上升, 此處以膠體電泳分離來自肥胖及控制組之人類 AT 蛋白水解產物, 並使用 mAb 9-3-1 偵測 Opn, mAb 9-3-1 能夠顯著地辨識經 MMP 切割之 Opn。另發現於 25 kD 處之條帶強度相較於一肌動蛋白之比例有顯著之上升, 該條帶係對應 C 端經切割之產物 (第 6 圖)。

【0225】 範例 7: 單株抗體定序

【0226】 mRNA 係萃取自雜交瘤細胞沉澱物, 係自該沉澱物中萃取總 RNA, 使用 dT 寡聚物引子對 RNA 進行反轉錄以產生 cDNA。該 cDNA 係

經 S.N.A.P 純化，並使用 5' RACE 套組以 TdT 對 cDNA 進行加尾。使用 AAP 及可變域之反向引子進行 PCR 反應，以擴增該單株抗體 DNA 的 V_H 及 V_L 區域。將該 V_H 及 V_L 產物選殖至 Invitrogen 定序載體 pCR2.1 中，並轉型進入 TOP10 細胞，續以 PCR 篩選陽性轉型株。挑出選定之菌落，並以 ABI3130xl Genetic Analyzer 進行 DNA 定序分析，結果係如第 7 圖(mAb 4-4-2)、第 8 圖(mAb 7-5-4 及 mAb 9-3-1，並發現 mAb 9-3-1 係與 mAb 7-5-4 相等)及第 9 圖(mAb 21-5-4)所示。

【0227】 本發明更進一步例示於(但不限於)下述實施例中：

【0228】 實施例 1：一種單株抗體，係對於人類骨調素(osteopontin)之一或多種截斷變異體(truncated variant)具有專一性，其中，該單株抗體對於該一或多種截斷變異體的反應性高於其對於全長之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列)的反應性；及該單株抗體係對於下述具有專一性：(A)經基質金屬蛋白酶截斷(matrix-metalloproteinase-truncated)之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列)，其中該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列)的反應性高於其對於全長之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列)的反應性及其對於經凝血酶截斷(thrombin-truncated)之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列)的反應性；或(B)經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列)及經凝血酶截斷之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列)，其中該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列)的反應性及其對於經凝血酶截斷之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列)的反應性皆高於其對於全長之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列)的反應性；或(C)經凝血酶截斷之人類骨調素(具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列)，其中該單株抗體係對於一

經凝血酶截斷之人類骨調素的抗原表位具有專一性，該經凝血酶截斷之人類骨調素的抗原表位具有選自由 VVYGLR、SVVYGLR 及 DSVVYGLR 所組成之群組（如 SEQ ID NOs：1~3 所示之序列）的胺基酸序列，當該單株抗體對於該胺基酸序列 SVVYGLR 具有專一性時，該單株抗體之重鏈（VH）的可變域及該單株抗體之輕鏈（VL）的可變域包含下述序列之互補性決定區（CDRs）：VH CDR1 GFSLSTYGLG（如 SEQ ID NO：18 所示之序列）、VH CDR2 IYWDDNK（如 SEQ ID NO：19 所示之序列）、VH CDR3 ARGTS PGVSFPY（如 SEQ ID NO：20 所示之序列）、VL CDR1 ENIYSY（如 SEQ ID NO：21 所示之序列）、VL CDR2 NAK（如 SEQ ID NO：22 所示之序列）、VL CDR3 QHHYGTPLT（如 SEQ ID NO：23 所示之序列），及該單株抗體對於經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性高於其對於全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性及其對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性，較佳地，VH 包含如 SEQ ID NO：24 所示之序列且 VL 包含如 SEQ ID NO：25 所示之序列。

【0229】 實施例 2：如實施例 1（A）所述之單株抗體，其中，該單株抗體係對於一經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素的抗原表位具有專一性，該經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素的抗原表位具有選自由 GDSVVYG、RGDSVVYG 及 DRGRDSVVYG 所組成之群組（如 SEQ ID NOs：7~9 所示之序列）的胺基酸序列。

【0230】 實施例 3：如實施例 1（B）所述之單株抗體，其中，該單株抗體係對於一經基質金屬蛋白酶／凝血酶截斷之人類骨調素的抗原表位具有專一性，該經基質金屬蛋白酶／凝血酶截斷之人類骨調素的抗原表位具有選自由 TYDGRGDSVVYG（如 SEQ ID NO：10 所示之序列）及

PTVDTYDGRGDS 所組成之群組（如 SEQ ID NO：14 所示之序列）的胺基酸序列。

【0231】 實施例 4：如實施例 2 所述之單株抗體，其中，該單株抗體係對於具有胺基酸序列 GDSVVYG 之抗原表位具有專一性，且該單株抗體之互補性決定區包含下述序列：VH CDR1 GITFNTNG（如 SEQ ID NO：26 所示之序列）、VH CDR2 VRSKDYNFAT（如 SEQ ID NO：27 所示之序列）、VH CDR3 VRPDYYGSSFAY（如 SEQ ID NO：28 所示之序列）、VL CDR1 QSIVHSNGNTY（如 SEQ ID NO：29 所示之序列）、VL CDR2 KVS（如 SEQ ID NO：30 所示之序列）、VL CDR3 FQGSHVPWT（如 SEQ ID NO：31 所示之序列），及較佳地，VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示之序列且 VL 包含如 SEQ ID NO：33 所示之序列。

【0232】 實施例 5：如實施例 3 所述之單株抗體，其中，該單株抗體係對於具有胺基酸序列 TYDGRGDSVVYG 之抗原表位具有專一性，且該單株抗體之互補性決定區包含下述序列：VH CDR1 GFSLSTSGLG（如 SEQ ID NO：34 所示之序列）、VH CDR2 ISWDDSK（如 SEQ ID NO：35 所示之序列）、VH CDR3 ARSGGGDS（如 SEQ ID NO：36 所示之序列）、VL CDR1 SSVNS（如 SEQ ID NO：37 所示之序列）、VL CDR2 DTS（如 SEQ ID NO：38 所示之序列）、VL CDR3 FQSGGYPLT（如 SEQ ID NO：39 所示之序列），及較佳地，VH 包含如 SEQ ID NO：40 所示之序列且 VL 包含如 SEQ ID NO：41 所示之序列。

【0233】 實施例 6：如實施例 1（C）、實施例 4 或實施例 5 所述之單株抗體，其中，該互補性決定區或重鏈或輕鏈之中的三個胺基酸突變為其他胺基酸；較佳地，該互補性決定區或重鏈或輕鏈之中的二個胺基酸突變為其他胺基酸；更佳地，該互補性決定區或重鏈或輕鏈之中的一個胺基酸突變為其他胺基酸。

【0234】 實施例 7：如實施例 1~6 中任一者所述之單株抗體，其中，當該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）具有專一性時，該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性係為其對於全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性及其對於經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性的 N 倍以上；及當該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）及經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）具有專一性時，該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性及其對於經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性係為其對於全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性的 N 倍以上；及當該單株抗體對於經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）具有專一性時，該單株抗體對於經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性係為其對於全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性及其對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性的 N 倍以上；及 N 係大於 1.5，較佳係大於 2，更佳係大於 3，再更佳係大於 5，最佳係大於 10；及較佳地，該單株抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）、經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）及全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性係分別於塗覆有經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）、經凝血酶截斷之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）及全長之人類骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示

之序列)的一薄板上，以 1%BSA 阻斷之後，透過酵素連結免疫吸附分析 (ELISA) 測定，且包含下述條件：單株抗體濃度：0.25 $\mu\text{g/ml}$ ，二級抗體，結合 HRP 之抗體濃度：0.1 $\mu\text{g/ml}$ ，HRP 受質：ABTS 及 0.1%過氧化氫，讀取：405 nm 之吸光值。

【0235】 實施例 8：如實施例 1~7 中任一者所述之單株抗體，其中，各該抗原表位之解離常數 (dissociation constant, K_d) 及/或各該人類骨調素蛋白之解離常數係低於 50 nM，較佳低於 20 nM，更佳低於 10 nM，再更佳低於 5 nM，最佳低於 2 nM。

【0236】 實施例 9：如實施例 1~8 中任一者所述之單株抗體，其中，各該抗原表位之解離速率值 (off-rate value) 及/或各該人類骨調素蛋白之解離速率值係低於 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ ，較佳低於 $3 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ ，更佳低於 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ ，再更佳低於 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 。

【0237】 實施例 10：如實施例 1~9 中任一者所述之單株抗體，其中該單株抗體係為人類化之單株抗體。

【0238】 實施例 11：如實施例 1~10 中任一者所述之單株抗體的一片
段，其中，較佳係為一單域抗體 (single-domain antibody)，其中該片段
對於下述具有專一性：(A) 經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列)，其中該片段對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列) 的反應性高於其對於全長之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列) 的反應性及其對於經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列) 的反應性；或 (B) 經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列) 及經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列)，其中該片段對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列) 的反應性及其對於經凝血酶截斷之人類骨調素 (具

有如 SEQ ID NO : 17 所示之序列) 的反應性皆高於其對於全長之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 15 所示之序列) 的反應性; 或 (C) 經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 17 所示之序列), 其中該片段對於經凝血酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 17 所示之序列) 的反應性高於其對於全長之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 15 所示之序列) 的反應性及其對於經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 16 所示之序列) 的反應性。

【0239】 實施例 12 : 一種藥學組合物, 包含 : 如實施例 1~10 中任一者所述之單株抗體中的至少一者及 / 或如實施例 11 所述之片段中的至少一者; 及至少一藥學可接受之賦型劑。

【0240】 實施例 13 : 一種疫苗, 包含至少一經分離之人類骨調素胜肽 : (A) 該至少一經分離之人類骨調素胜肽具有選自由 GDSVVYG、RGDSVVYG 及 DGRGDSVVYG 所組成之群組 (如 SEQ ID NOs : 7~9 所示之序列) 及 GRGDSVVYG (如 SEQ ID NO : 55 所示之序列) 的一或多個序列; 及 / 或 (B) 至少一經分離之人類骨調素胜肽具有選自由 TYDGRGDSVVYG (如 SEQ ID NO : 10 所示之序列)、VDTYDGRGDSV (如 SEQ ID NO : 13 所示之序列)、PTVDTYDGRGDS (如 SEQ ID NO : 14 所示之序列)、DTYDGRGDSVY (如 SEQ ID NO : 56 所示之序列) 及 VDTYDGRGDSV (如 SEQ ID NO : 57 所示之序列) 所組成之群組的一或多個序列, 其中該胜肽之 C 端較佳係經醯胺化, 特別是序列為 VDTYDGRGDSV (如 SEQ ID NO : 13 所示之序列) 或 PTVDTYDGRGDS (如 SEQ ID NO : 14 所示之序列) 之該胜肽; 及 / 或 (C) 至少一經分離之人類骨調素胜肽具有選自由 VVYGLR、SVVYGLR 及 DSVVYGLR 所組成之群組 (如 SEQ ID NOs : 1~3 所示之序列) 及 GDSVVYGLR (如 SEQ ID NO : 58 所示之序列) 的一或多個序列; 及該胜肽係結合或融合於一藥

學可接受之載劑，該藥學可接受之載劑較佳為一蛋白載劑，且該胜肽較佳係共價鍵結於該載劑。

【0241】 實施例 14：如實施例 13 所述之疫苗，其中，該載劑係為一蛋白，較佳係選自由鑰孔血藍素、破傷風類病毒、蛋白 D 或白喉毒素，特別係鑰孔血藍素。

【0242】 實施例 15：如實施例 14 所述之疫苗，其中，該至少一胜肽具有一半胱胺酸添加於其 N 端及／或 C 端且該至少一胜肽係透過該半胱胺酸共價鍵結於該蛋白載劑或結合於該蛋白載劑之一連接片段（linker），該連接片段較佳包含與該胜肽之半胱胺酸反應之一順丁烯二醯亞胺基團或一鹵化乙醯基團。

【0243】 實施例 16：如實施例 13～15 中任一者所述之疫苗，另包含至少一藥學可接受之賦型劑及／或佐劑。

【0244】 實施例 17：如實施例 12 所述之藥學組合物或如實施例 13～16 中任一者所述之疫苗用於治療之用途。

【0245】 實施例 18：如實施例 12 所述之藥學組合物或如實施例 13～16 中任一者所述之疫苗用於治療及／或預防心血管疾病，更具體為動脈粥狀硬化。

【0246】 實施例 19：如實施例 12 所述之藥學組合物或如實施例 13～16 中任一者所述之疫苗用於治療及／或預防第二型糖尿病，更具體為肥胖症相關之胰島素抗性。

【0247】 實施例 20：一種單株抗體的製造方法，用以製造如實施例 1～10 中任一者所述之單株抗體，包含：以細胞培養表現該單株抗體；及純化該單株抗體。

【0248】 實施例 21：一種疫苗的製造方法，用以製造如實施例 13～16 中任一者所述之疫苗，包含：提供該胜肽；及將該胜肽結合於該載劑，

較佳係為鑰孔血藍素蛋白；及選擇性地添加藥學可接受之賦型劑。

【0249】 實施例 22：一種診斷方法，包含：提供該病患之一分離樣品，較佳係來自血液及／或脂肪組織之樣品，特別係來自皮下脂肪組織；使用如實施例 1～10 中任一者所述之單株抗體測量該樣品中經凝血酶截斷之人類骨調素、經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素之濃度及／或經凝血酶截斷之人類骨調素及經基質金屬蛋白酶截斷之人類骨調素之聚集濃度，較佳係透過酵素連結免疫吸附分析或西方墨點法 (Western blot)；及將上述濃度與一健康之控制族群的濃度及／或該病患於早前時間點之濃度做比較；產生一診斷或預後，該診斷或預後係針對一疾病或狀態針對或該疾病或狀態之進程，較佳係針對心血管疾病，更具體為動脈粥狀硬化，或針對第二型糖尿病，更具體為肥胖症相關之胰島素抗性。

【0250】 實施例 23：以實施例 22 所述之診斷方法用於監控如實施例 17～19 中任一者所述之一治療方法的成效。

【符號說明】

(無)

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

(無)

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

(無)

【序列表】

<110> 亞佛瑞司股份有限公司

<120> 針對骨調素截斷變異體的疫苗及單株抗體暨其用途

<130> R67614

<160> 58

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 1

Val Val Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 2

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 3

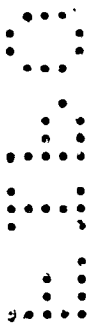
<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位



<400> 3

Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 4

Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 5

Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1 5 10

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 6

Asp Ser Val Val Tyr Gly

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 7

Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 8

Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 9

Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

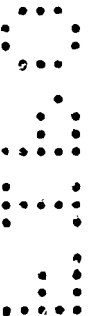
<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 10

Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly

1 5 10



<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 11

Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 12

Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly

1

5

10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 13

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val

1

5

10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 14

Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser
 1 5 10

<210> 15

<211> 314

<212> PRT

<213> 人類 (*Homo sapiens*)

<220>

<223> 骨調素 (Opn)

<400> 15

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
 1 5 10 15
 Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
 20 25 30
 Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
 35 40 45
 Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu
 50 55 60
 Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
 65 70 75 80
 Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His
 85 90 95
 Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp
 100 105 110
 Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu
 115 120 125
 Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu
 130 135 140
 Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly
 145 150 155 160
 Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg
 165 170 175
 Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His
 180 185 190
 Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala
 195 200 205
 Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser
 210 215 220
 Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His
 225 230 235 240

Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu
 245 250 255
 His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu
 260 265 270
 Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
 275 280 285
 Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His
 290 295 300
 Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
 305 310

<210> 16

<211> 166

<212> PRT

<213> 人類 (*Homo sapiens*)

<220>

<223> MmpOpn

<400> 16

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
 1 5 10 15
 Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
 20 25 30
 Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
 35 40 45
 Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu
 50 55 60
 Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
 65 70 75 80
 Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His
 85 90 95
 Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp
 100 105 110
 Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu
 115 120 125
 Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu
 130 135 140
 Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly
 145 150 155 160
 Asp Ser Val Val Tyr Gly
 165

<210> 17

<211> 168
 <212> PRT
 <213> 人類 (*Homo sapiens*)

<220>
 <223> ThrOpn

<400> 17

Met	Arg	Ile	Ala	Val	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Leu	Gly	Ile	Thr	Cys	Ala
1				5					10					15	
Ile	Pro	Val	Lys	Gln	Ala	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Glu	Glu	Lys	Gln	Leu
			20					25					30		
Tyr	Asn	Lys	Tyr	Pro	Asp	Ala	Val	Ala	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	Asp	Pro
		35					40					45			
Ser	Gln	Lys	Gln	Asn	Leu	Leu	Ala	Pro	Gln	Asn	Ala	Val	Ser	Ser	Glu
	50					55					60				
Glu	Thr	Asn	Asp	Phe	Lys	Gln	Glu	Thr	Leu	Pro	Ser	Lys	Ser	Asn	Glu
65					70					75				80	
Ser	His	Asp	His	Met	Asp	Asp	Met	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	His
				85					90					95	
Val	Asp	Ser	Gln	Asp	Ser	Ile	Asp	Ser	Asn	Asp	Ser	Asp	Asp	Val	Asp
			100						105					110	
Asp	Thr	Asp	Asp	Ser	His	Gln	Ser	Asp	Glu	Ser	His	His	Ser	Asp	Glu
			115					120					125		
Ser	Asp	Glu	Leu	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Thr	Asp	Leu	Pro	Ala	Thr	Glu
		130					135					140			
Val	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Pro	Thr	Val	Asp	Thr	Tyr	Asp	Gly	Arg	Gly
145					150					155					160
Asp	Ser	Val	Val	Tyr	Gly	Leu	Arg								
				165											

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 4-4-2 VH CDR1

<400> 18

Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Tyr	Gly	Leu	Gly
1				5					10

<210> 19

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

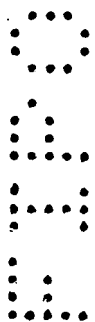
<220>
 <223> mAb 4-4-2 VH CDR2

<400> 19
 Ile Tyr Trp Asp Asp Asn Lys
 1 5

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 4-4-2 VH CDR3

<400> 20
 Ala Arg Gly Thr Ser Pro Gly Val Ser Phe Pro Tyr
 1 5 10



<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 4-4-2 VL CDR1

<400> 21
 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 4-4-2 VL CDR2

<400> 22

Asn Ala Lys

1

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 4-4-2 VL CDR3

<400> 23

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 24

<211> 151

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 4-4-2 VH

<400> 24

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr

1

5

10

15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln

20

25

30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu

35

40

45

Ser Thr Tyr Gly Leu Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys

50

55

60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asn Lys Arg Tyr

65

70

75

80

Lys Ser Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser

85

90

95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala

100

105

110

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

115

120

125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro

130

135

140

Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala

145

150

<210> 25
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 4-4-2 VL

<400> 25

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Phe Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
 100 105 110
 Gly Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VH CDR1

<400> 26

Gly Ile Thr Phe Asn Thr Asn Gly
 1 5

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VH CDR2

<400> 27
 Val Arg Ser Lys Asp Tyr Asn Phe Ala Thr
 1 5 10

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VH CDR3

<400> 28
 Val Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VL CDR1

<400> 29
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VL CDR2

<400> 30
 Lys Val Ser
 1

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VL CDR3

<400> 31
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 32
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VH

<400> 32
 Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
 1 5 10 15
 Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Lys Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Phe
 35 40 45
 Asn Thr Asn Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Arg Val Arg Ser Lys Asp Tyr Asn Phe Ala Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr
 130 135 140

Pro Pro Pro Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 145 150

<210> 33
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 7-5-4 VL

<400> 33
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Phe
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 165

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mAb 21-5-4 VH CDR1

<400> 34

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Leu Gly
1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 21-5-4 VH CDR2

<400> 35

Ile Ser Trp Asp Asp Ser Lys

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 21-5-4 VH CDR3

<400> 36

Ala Arg Ser Gly Gly Gly Asp Ser Asp

1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 21-5-4 VL CDR1

<400> 37

Ser Ser Val Asn Ser

1 5

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 21-5-4 VL CDR2

<400> 38

Asp Thr Ser

1

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 21-5-4 VL CDR3

<400> 39

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 40

<211> 149

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 21-5-4 VH

<400> 40

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr

1

5

10

15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Met Leu Lys

20

25

30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu

35

40

45

Ser Thr Ser Gly Leu Gly Ile Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys

50

55

60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Ser Trp Asp Asp Ser Lys Tyr Tyr

65

70

75

80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg

85

90

95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Asn Val Gly Thr Ala Asp Ser Ala

100

105

110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Gly Asp Ser Asp Trp Gly Gln

115

120

125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro
 145

<210> 41

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb 21-5-4 VL

<400> 41

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Ala Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn
 35 40 45
 Ser Ser Val Asn Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser
 50 55 60
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asp Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 130 135 140
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Lys

<210> 42

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 42
agcggctctt caatgatacc agttaaacag gctgattc 38

<210> 43
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 43
agcggctctt ctcccattga cctcagaaga tgcact 36

<210> 44
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

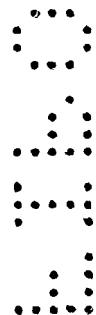
<400> 44
agcggctctt ctcccctatc cataaaccac actatcacc 39

<210> 45
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>引子

<400> 45
agcggctctt ctcccctacc tcagtccata aaccacac 38

<210> 46
<211> 7
<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自小鼠之抗原表位 (Mouse-derived peptide epitope)

<400> 46

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 47

<211> 16

<212> PRT

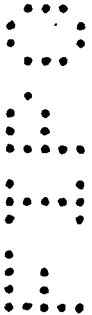
<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生自小鼠之抗原表位 (Mouse-derived peptide epitope)

<400> 47

Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10 15



<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 48

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10 15
Ser

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 49

Cys Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 50

Tyr Gly Leu Arg

1

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 51

Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 52

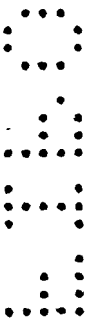
Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser

1 5

<210> 53

<211> 12

<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 53

Thr Tyr Asp Gly Ala Ala Ala Ser Val Val Tyr Gly
1 5 10

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

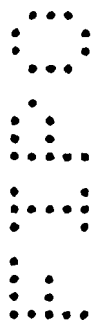
<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 54

Thr Ala Ala Ala Arg Gly Asp Ala Ala Ala Tyr Gly
1 5 10



<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 55

Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly
1 5

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胜肽抗原表位

<400> 56

Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

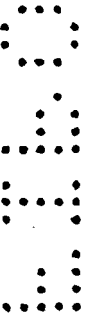
<220>
<223> 胜肽抗原表位

<400> 57
Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val
1 5 10

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽抗原表位

<400> 58
Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5



發明摘要

※ 申請案號：104119828

※ 申請日：104. 6. 18

※IPC 分類：

C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K39/385 (2006.01)

A61P9/10 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

G01N33/577 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

針對骨調素截斷變異體的疫苗及單株抗體暨其用途 / Vaccines and Monoclonal Antibodies Targeting Truncated Variants of Osteopontin and Uses Thereof

【中文】

本發明提供針對一或多種人類骨調素的截斷變異體具有專一性的單株抗體及疫苗，包含至少一經分離之人類骨調素胜肽，以及製造所述抗體及疫苗的方法。此外，本發明另提供利用所述抗體的診斷方法。所述抗體及疫苗係用於治療方法之應用，特別是治療及／或預防第二型糖尿病及心血管疾病。

【英文】

The present invention provides monoclonal antibodies specific for one or more truncated variants of human osteopontin and vaccines comprising at least one isolated osteopontin peptide, as well methods for manufacturing said antibodies and vaccines. Furthermore, a diagnostic method making use of said antibodies is provided. Said antibodies and vaccines are used in therapy, especially in treatment and/or prevention of type-2 diabetes and cardiovascular disease.

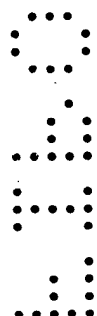
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）



申請專利範圍

1. 一種單株抗體，係對於人類骨調素（osteopontin）之一或多種截斷變異體（truncated variant）具有專一性，其中，該抗體對於該一或多種截斷變異體的反應性高於其對於全長之骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性；及

該抗體係對於下述具有專一性：

(A) 經基質金屬蛋白酶截斷（matrix-metalloproteinase-truncated）之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列），其中該抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性高於其各別對於全長之骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）及經凝血酶截斷（thrombin-truncated）之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性；或

(B) 經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）及經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列），其中該抗體各別對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）及經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性皆高於其對於全長之骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性；或

(C) 經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列），其中該抗體係對於一經凝血酶截斷之骨調素的抗原表位（epitope）具有專一性，該經凝血酶截斷之骨調素的抗原表位具有選自由 VVYGLR、SVVYGLR 及 DSVVYGLR 所組成之群組（如 SEQ ID NOs：1~3 所示之序列）的胺基酸序列，當該抗體對於具有 SVVYGLR 之胺基酸序列的抗原表位有專一性時，該抗體之重鏈（heavy chain，V_H）的可變域及該抗體之輕鏈（light chain，V_L）的可變域包含下述序列之

互補性決定區 (complementarity-determining regions, CDRs) :

V_H CDR1 GFSLSTYGLG (如 SEQ ID NO : 18 所示之序列)、

V_H CDR2 IYWDDNK (如 SEQ ID NO : 19 所示之序列)、

V_H CDR3 ARGTSPGVSPFY (如 SEQ ID NO : 20 所示之序列)、

V_L CDR1 ENIYSY (如 SEQ ID NO : 21 所示之序列)、

V_L CDR2 NAK (如 SEQ ID NO : 22 所示之序列)、

V_L CDR3 QHHYGTPLT (如 SEQ ID NO : 23 所示之序列)、

其中該抗體對於經凝血酶截斷之骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 17 所示之序列) 的反應性高於其各別對於全長之骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 15 所示之序列) 及經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素 (具有如 SEQ ID NO : 16 所示之序列) 的反應性, 較佳地, 該重鏈包含如 SEQ ID NO : 24 所示之序列且該輕鏈包含如 SEQ ID NO : 25 所示之序列。

2. 如申請專利範圍第 1 項之 (A) 所述之抗體, 其中, 該抗體係對於一經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素的抗原表位具有專一性, 該經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素的抗原表位具有選自由 GDSVVY~~G~~、RGDSVVY~~G~~及 DRGRDSVVY~~G~~ 所組成之群組 (如 SEQ ID NOs : 7~9 所示之序列) 的胺基酸序列。
3. 如申請專利範圍第 1 項之 (B) 所述之抗體, 其中, 該抗體係對於一經基質金屬蛋白酶/凝血酶截斷之骨調素的抗原表位具有專一性, 該經基質金屬蛋白酶/凝血酶截斷之骨調素的抗原表位具有選自由 TYDGRGDSVVY~~G~~ (如 SEQ ID NO : 10 所示之序列) 及 PTVDTYDGRGDS 所組成之群組 (如 SEQ ID NO : 14 所示之序列) 的胺基酸序列。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述之抗體, 其中, 該抗體係對於具有 GDSVVY~~G~~ 之胺基酸序列的抗原表位有專一性, 且該抗體之互補性決

定區包含下述序列：

V_H CDR1 GITFNTNG (如 SEQ ID NO : 26 所示之序列)、

V_H CDR2 VRSKDYNFAT (如 SEQ ID NO : 27 所示之序列)、

V_H CDR3 VRPDYYGSSFAY (如 SEQ ID NO : 28 所示之序列)、

V_L CDR1 QSIVHSNGNTY (如 SEQ ID NO : 29 所示之序列)、

V_L CDR2 KVS (如 SEQ ID NO : 30 所示之序列)、

V_L CDR3 FQGSHPVWT (如 SEQ ID NO : 31 所示之序列)、

及較佳地，重鏈包含如 SEQ ID NO : 32 所示之序列且輕鏈包含如 SEQ ID NO : 33 所示之序列。

5. 如申請專利範圍第 3 項所述之抗體，其中，該抗體係對於具有 TYDGRGDSVVYG 之胺基酸序列的抗原表位有專一性，且該抗體之互補性決定區包含下述序列：

V_H CDR1 GFSLSTGLG (如 SEQ ID NO : 34 所示之序列)、

V_H CDR2 ISWDDSK (如 SEQ ID NO : 35 所示之序列)、

V_H CDR3 ARSGGGDSD (如 SEQ ID NO : 36 所示之序列)、

V_L CDR1 SSVNS (如 SEQ ID NO : 37 所示之序列)、

V_L CDR2 DTS (如 SEQ ID NO : 38 所示之序列)、

V_L CDR3 FQSGGYPLT (如 SEQ ID NO : 39 所示之序列)、

及較佳地，重鏈包含如 SEQ ID NO : 40 所示之序列且輕鏈包含如 SEQ ID NO : 41 所示之序列。

6. 如申請專利範圍第 1 項之 (C)、第 4 項或第 5 項所述之抗體，其中，該互補性決定區或重鏈或輕鏈之互補性決定區之中的三個胺基酸突變為任何其他胺基酸；較佳地，該互補性決定區或重鏈或輕鏈之中的二個胺基酸突變為任何其他胺基酸；更佳地，該互補性決定區或重鏈或輕鏈之中的一個胺基酸突變為任何其他胺基酸。

7. 如申請專利範圍第 1~6 項之任一項所述之抗體，其中，
- 當該抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）具有專一性時，該抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性係為其各別對於全長之骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）及經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性的 N 倍以上；及
- 當該抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）及經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）具有專一性時，該抗體各別對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）及經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性係為其對於全長之骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性的 N 倍以上；
- 及
- 當該抗體對於經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）具有專一性時，該抗體對於經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）的反應性係為其各別對於全長之骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）及經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）的反應性的 N 倍以上；及
- N 係大於 1.5，較佳係大於 2，更佳係大於 3，再更佳係大於 5，最佳係大於 10；及
- 較佳地，該抗體對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：16 所示之序列）、經凝血酶截斷之骨調素（具有如 SEQ ID NO：17 所示之序列）及全長之骨調素（具有如 SEQ ID NO：15 所示之序列）的反應性係分別於塗覆有經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素（具有如

SEQ ID NO: 16 所示之序列)、經凝血酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列)及全長之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列)的一薄板上,以 1% BSA 阻斷之後,透過酵素連結免疫吸附分析(ELISA)測定,且包含下述條件:

抗體濃度: 0.25 $\mu\text{g/ml}$,

二級、結合 HRP 之抗體濃度: 0.1 $\mu\text{g/ml}$,

HRP 受質: ABTS 及 0.1% 過氧化氫,

讀取: 405 nm 之吸光值。

8. 如申請專利範圍第 1~7 項之任一項所述之抗體,其中,各該抗原表位之解離常數(dissociation constant, K_d)及/或各該骨調素蛋白之解離常數係低於 50 nM,較佳低於 20 nM,更佳低於 10 nM,再更佳低於 5 nM,最佳低於 2 nM;及/或

各該抗原表位之解離速率值(off-rate value)及/或各該骨調素蛋白之解離速率值係低於 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$,較佳低於 $3 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$,更佳低於 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$,

再更佳低於 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$;及/或

該抗體係為人類化之抗體。

9. 如申請專利範圍第 1~8 項之任一項所述之抗體的一片段,其中,較佳係為一單域抗體(single-domain antibody),其中該片段係對於下述具有專一性:

(A) 經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列),其中該片段對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列)的反應性高於其各別對於全長之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列)及經凝血酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列)的反應性;或

(B) 經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 16 所示

之序列)及經凝血酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列), 其中該片段各別對於經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列)及經凝血酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列)的反應性皆高於其對於全長之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列)的反應性; 或

(C) 經凝血酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列), 其中該片段對於經凝血酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 17 所示之序列)的反應性高於其各別對於全長之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 15 所示之序列)及經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素(具有如 SEQ ID NO: 16 所示之序列)的反應性。

10. 一種藥學組合物, 包含:

如申請專利範圍第 1~8 項之任一項所述之抗體中的至少一者及/或如申請專利範圍第 9 項所述之片段中的至少一者; 及
至少一藥學可接受之賦型劑。

11. 一種疫苗, 包含至少一經分離之骨調素胜肽:

(A) 該至少一經分離之骨調素胜肽具有自由 GDSVVYG·RGDSVVYG 及 DGRGDSVVYG 所組成之群組(如 SEQ ID NOs: 7~9 所示之序列)及 GRGDSVVYG(如 SEQ ID NO: 55 所示之序列)的一或多個序列; 及/或

(B) 該至少一經分離之骨調素胜肽具有選自由 TYDGRGDSVVYG(如 SEQ ID NO: 10 所示之序列)、VDTYDGRGDSVV(如 SEQ ID NO: 13 所示之序列)、PTVDTYDGRGDS(如 SEQ ID NO: 14 所示之序列)、DTYDGRGDSVVY(如 SEQ ID NO: 56 所示之序列)及 VDTYDGRGDSV(如 SEQ ID NO: 57 所示之序列)所組成之群組的一或多個序列, 其中該胜肽, 特別是序列為 VDTYDGRGDSVV(如 SEQ ID NO: 13 所示

之序列)或 PTVDTYDGRGDS (如 SEQ ID NO: 14 所示之序列)之該
 胜肽,其 C 端較佳係經醯胺化;及/或

(C) 該至少一經分離之骨調素胜肽具有選自由 VVYGLR、SVVYGLR
 及 DSVVYGLR 所組成之群組(如 SEQ ID NOs: 1~3 所示之序列)及
 GDSVVYGLR (如 SEQ ID NO: 58 所示之序列)的一或多個序列;

及該胜肽係結合或融合於一藥學可接受之載劑,該藥學可接受之載劑
 較佳為一蛋白載劑,且該胜肽較佳係共價鍵結於該載劑;較佳地,該
 載劑係為一蛋白,較佳係選自鑰孔血藍素(keyhole limpet
 haemocyanin, KLH)、破傷風類病毒(tetanus toxoid, TT)、蛋白 D (protein
 D) 或白喉毒素(diphtheria toxin, DT),特別係鑰孔血藍素,及

特別係該至少一胜肽具有一半胱胺酸添加於其 N 端及/或 C 端,且該
 至少一胜肽係透過該半胱胺酸共價鍵結於該蛋白載劑或結合於該蛋白
 載劑之一連接片段(linker),該連接片段較佳包含與該胜肽之半胱胺酸
 反應的一順丁烯二醯亞胺基團或一鹵化乙醯基團;及/或

該疫苗較佳另包含至少一藥學可接受之賦型劑及/或佐劑。

12. 如申請專利範圍第 10 項所述之組合物或如申請專利範圍第 11 項所述
 之疫苗用於治療之用途;

較佳地,係用於治療及/或預防心血管疾病,更具體為動脈粥狀硬化
 (atherosclerosis); 或

較佳地,係用於治療及/或預防第二型糖尿病,更具體為肥胖症相關
 之胰島素抗性。

13. 一種抗體的製造方法,係用以製造如申請專利範圍第 1~8 項之任一項
 所述之抗體,包含:

以細胞培養表現該抗體;及

純化該抗體。

14. 一種疫苗的製造方法，係用以製造如申請專利範圍第 11 項所述之疫苗，包含：
- 提供該胜肽；及
 - 將該胜肽結合於該載劑，較佳係為鑰孔血藍素蛋白；及
 - 選擇性地添加藥學可接受之賦型劑。
15. 一種診斷方法，包含：
- 提供該病患之一分離樣品，較佳係來自血液及／或脂肪組織之樣品，特別係來自皮下脂肪組織；
 - 使用如申請專利範圍第 1~9 項之任一項所述之抗體測量該樣品中經凝血酶截斷之骨調素、經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素之濃度及／或經凝血酶截斷之骨調素及經基質金屬蛋白酶截斷之骨調素之聚集濃度，較佳係透過酵素連結免疫吸附分析或西方墨點法（Western blot）；及
 - 將上述濃度與一健康之控制族群的濃度及／或該病患於早前時間點之濃度做比較；
 - 產生一診斷或預後，該診斷或預後係針對一疾病或狀態針對或該疾病或狀態之進程，較佳係針對心血管疾病，更具體為動脈粥狀硬化，或針對第二型糖尿病，更具體為肥胖症相關之胰島素抗性；
 - 更具體而言，該方法係用於監控如申請專利範圍第 12 項所述之一治療方法的成效。

