

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680014543.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 23 日

[11] 公开号 CN 101166764A

[22] 申请日 2006.2.28

[21] 申请号 200680014543.2

[30] 优先权

[32] 2005.2.28 [33] US [31] 60/656,943

[86] 国际申请 PCT/US2006/006998 2006.2.28

[87] 国际公布 WO2006/093923 英 2006.9.8

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.29

[71] 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 K·L·休厄尔 乔安妮·匡

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴

权利要求书 5 页 说明书 81 页 序列表 22 页
附图 4 页

[54] 发明名称

骨病症的治疗

[57] 摘要

提供了治疗哺乳动物中的各种骨适应症，诸如骨质疏松的方法，其中施用有效量的结合 B 细胞表面标志的拮抗剂，诸如 CD20 抗体，任选还一起施用有效量的另一药物，诸如治疗此类病症的药剂。还提供了制品。另外，提供了抑制哺乳动物中的骨质溶解的方法，包括向所述哺乳动物中导入分离的牙原细胞或骨原细胞，所述牙原细胞或骨原细胞包含编码结合 B 细胞表面标志的抗体的核酸。

1. 治疗哺乳动物中的骨病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的 CD20 抗体。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体是嵌合的、人的或人源化的抗体。
3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述抗体包括 rituximab。
4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述抗体是人源化的 2H7，其包含 SEQ ID NO:2 及 8 中的可变域序列。
5. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述抗体是人源化的 2H7，其包含 SEQ ID NO:8 中带有改变 N100A 或 D56A/N100A 的重链可变域及 SEQ ID NO:2 中带有改变 M32L、S92A 或 M32L/S92A 的轻链可变域。
6. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述抗体是人源化的 2H7，其包含 SEQ ID NO:30 的轻链可变区(V_L)序列及 SEQ ID NO:8 的重链可变区(V_H)序列，其中该抗体还在 VH-CDR2 中含有氨基酸替代 D56A 且 VH-CDR3 中的 N100 替代为 Y 或 W。
7. 权利要求 6 的方法，其中所述抗体包含 SEQ ID NO:31 的 v511 轻链序列及 SEQ ID NO:32 的 v511 重链序列。
8. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中所述抗体是裸抗体。
9. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中所述抗体与另一分子偶联。
10. 权利要求 9 的方法，其中所述抗体与骨靶向剂共价连接。
11. 权利要求 1-10 任一项的方法，其中所述抗体在施用于哺乳动物后诱导主要临床响应。
12. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述抗体施用的剂量为约 400 mg 到 1.3 g，施用的频率为约一个月期间内约 1 到 4 剂。
13. 权利要求 12 的方法，其中每一剂为约 500 mg 到 1.2 g。
14. 权利要求 12 或 13 的方法，其中每一剂为约 750 mg 到 1.1 g。
15. 权利要求 12-14 任一项的方法，其中所述抗体以 2 到 4 剂施用。
16. 权利要求 12-15 任一项的方法，其中所述抗体以 2 到 3 剂施用。
17. 权利要求 12-16 任一项的方法，其中所述抗体在约 2 到 3 周期间内施用。
18. 权利要求 17 的方法，其中所述期间为约 2 周。
19. 权利要求 1-18 任一项的方法，其中所述哺乳动物是人。

20. 权利要求 1-19 任一项的方法，其中所述抗体局部施用于关节。
21. 权利要求 1-20 任一项的方法，其中所述抗体局部施用于骨缺损位点。
22. 权利要求 21 的方法，其中所述骨缺损位点是骨折、骨移植位点、植入物位点或牙周袋。
23. 权利要求 1-19 任一项的方法，其中所述抗体系统施用。
24. 权利要求 1-19 或 23 任一项的方法，其中所述抗体静脉内施用。
25. 权利要求 1-19 或 23 任一项的方法，其中所述抗体皮下施用。
26. 权利要求 1-25 任一项的方法，其中施用有效量的第二药物，其中所述 CD20 抗体为第一药物。
27. 权利要求 26 的方法，其中所述第二药物多于一种药物。
28. 权利要求 26 或 27 的方法，其中所述第二药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂、免疫抑制剂、缓解疾病的抗风湿药物(DMARD)、细胞毒剂、整联蛋白拮抗剂、非类固醇抗炎药物(NSAID)、激素、或其组合。
29. 权利要求 28 的方法，其中所述第二药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂或免疫抑制剂，或上述二者。
30. 权利要求 29 的方法，其中所述第二药物是免疫抑制剂。
31. 权利要求 30 的方法，其中所述免疫抑制剂是环磷酰胺、苯丁酸氮芥、来氟米特、硫唑嘌呤或甲氨喋呤。
32. 权利要求 31 的方法，其中所述免疫抑制剂是环磷酰胺或甲氨喋呤。
33. 权利要求 29 的方法，其中所述第二药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂。
34. 权利要求 33 的方法，其中所述药剂是护骨蛋白、白介素、MMP 抑制剂、 β 葡聚糖、整联蛋白拮抗剂、降钙素、质子泵抑制剂、蛋白酶抑制剂、二膦酸盐/酯、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、转化生长因子- α 抑制剂、转化生长因子- β 、骨形态发生蛋白、甲状旁腺素、成纤维细胞生长因子、维生素 D、钙、氟、镁、硼、玻连蛋白、纤溶酶原激活物抑制剂或蛋白酶抑制剂。
35. 权利要求 34 的方法，其中所述药剂是细胞因子或二膦酸盐/酯。
36. 权利要求 33-35 任一项的方法，其中所述药剂施用的量低于未对用该药剂治疗的哺乳动物施用 CD20 抗体的情况下所使用的量。
37. 权利要求 1-36 任一项的方法，其中所述哺乳动物先前从未用 CD20 抗

体治疗过。

38. 权利要求 1-37 任一项的方法，其中所述骨病症是骨质疏松，骨质疏松性骨折，局灶性骨丢失，骨缺损，儿童期特发性骨丢失，牙槽骨丢失，下颌骨丢失，牙槽骨丢失，与牙周炎有关的骨丢失，与自身免疫病有关的骨丢失，或多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症或单克隆丙种球蛋白病中的骨疾病。
39. 权利要求 38 的方法，其中所述骨病症是局灶性骨丢失，多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症或单克隆丙种球蛋白病中的骨疾病，与自身免疫病有关的骨丢失，类风湿性关节炎，或骨质疏松。
40. 权利要求 39 的方法，其中所述骨病症是与类风湿性关节炎或继发性骨质疏松有关的骨丢失。
41. 权利要求 39 的方法，其中所述骨病症是局灶性骨丢失。
42. 权利要求 1-37 任一项的方法，其中所述 CD20 抗体的量有效预防炎性关节炎中的侵蚀性骨疾病。
43. 权利要求 42 的方法，其中所述炎性关节炎是类风湿性关节炎。
44. 权利要求 1-38 任一项的方法，其中所述骨病症与类风湿性关节炎或发生类风湿性关节炎的风险无关。
45. 权利要求 1-44 任一项的方法，其中抗体在投递媒介中施用。
46. 权利要求 45 的方法，其中所述投递媒介是骨粉、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚甲基丙烯酸酯、生物可降解聚酯、水性聚合凝胶或纤维蛋白粘合剂。
47. 治疗哺乳动物中的骨病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的结合 B 细胞表面标志的抗体。
48. 治疗哺乳动物中的骨病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的结合 B 细胞表面标志的拮抗剂。
49. 制品，包括：
 - i. 装有 CD20 抗体的容器；及
 - ii. 印有治疗哺乳动物中的骨病症的说明书的包装插页，其中所述说明书指示将有效量的 CD20 抗体施用于哺乳动物。
50. 权利要求 49 的制品，还包括装有第二药物的容器，其中所述 CD20 抗体是第一药物，还包括所述包装插页上用第二药物治疗哺乳动物的说

明书。

51. 权利要求 50 的制品, 其中所述第二药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂、免疫抑制剂、细胞毒剂、整联蛋白拮抗剂或激素。
52. 权利要求 50 或 51 的制品, 其中所述第二药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂或免疫抑制剂, 或上述二者。
53. 抑制哺乳动物中的骨质溶解的方法, 包括向所述哺乳动物中导入分离的牙原细胞或骨原细胞, 所述牙原细胞或骨原细胞包含编码结合 B 细胞表面标志的抗体的核酸。
54. 权利要求 53 的方法, 其中所述细胞是牙原细胞。
55. 权利要求 54 的方法, 其中所述哺乳动物患有或有风险发生牙周炎。
56. 权利要求 54 的方法, 其中所述哺乳动物患有或有风险发生牙周疾病所致的牙槽骨丢失。
57. 权利要求 54 的方法, 其中所述细胞施用于颌的下颌部分中的牙周韧带。
58. 权利要求 53 的方法, 其中所述细胞是骨原细胞。
59. 权利要求 58 的方法, 其中所述细胞植入到所述哺乳动物的连接关节中。
60. 权利要求 58 的方法, 其中所述细胞施用于胫骨内。
61. 权利要求 58 的方法, 其中所述细胞施用于股骨内。
62. 权利要求 53-61 任一项的方法, 其中所述抗体的表达受抗生素化合物的调控。
63. 权利要求 62 的方法, 其中所述抗生素化合物是四环素或四环素类似物。
64. 权利要求 63 的方法, 还包括对所述哺乳动物施用米诺环素。
65. 权利要求 62-64 任一项的方法, 其中所述抗生素化合物系统施用。
66. 权利要求 53-65 任一项的方法, 还包括施用治疗破骨细胞相关病症的药剂。
67. 权利要求 66 的方法, 其中所述药剂是白介素-4 或肿瘤坏死因子- α 抑制剂。
68. 权利要求 53-67 任一项的方法, 其中所述哺乳动物患有或有风险发生类风湿性关节炎。
69. 权利要求 53-67 任一项的方法, 其中所述哺乳动物未患有或没有风险发生类风湿性关节炎。
70. 权利要求 53 或 58-69 任一项的方法, 其中所述哺乳动物患有或有风险

发生根尖周或软骨内骨丢失、人工关节颗粒诱发的骨质溶解、或溶骨性骨转移。

71. 权利要求 53-70 任一项的方法，其中所述抗体是 CD20 抗体。

骨病症的治疗

本申请依据 35 U.S.C. § 119(e) 要求 2005 年 2 月 28 日提交的美国临时专利申请第 60/656,943 号的优先权，本文收入该申请的全部内容。

发明领域

本发明涉及用结合 B 细胞表面标志（诸如 CD20 或 CD22）的拮抗剂，例如结合 CD20 的抗体来治疗骨病症。

发明背景

骨病症

骨重建(bone remodelling)是维持组织量和骨骼构造的动态过程。该过程是骨重吸收和骨形成之间的平衡，认为两种细胞类型即破骨细胞和成骨细胞起主要作用。成骨细胞合成新骨并将其沉积到破骨细胞挖凿出的孔洞中。成骨细胞和破骨细胞的活性受到许多系统性和局部性因素的调控，包括生长因子。

骨是一种特化的动态结缔组织，它发挥下列功能：(a)机械功能，作为肌肉附着的支持和位点以供运动；(b)保护功能，保护重要器官和骨髓；(c)代谢功能，作为离子，尤其是钙和磷酸根的储库，以维持生命必需的血浆稳态。骨经历着持续的吸收和更新，这个过程统称为重建。因此，骨在机械及生物学上的完整性依赖于其在数以百万计的微观位点上进行的持续破坏（吸收）和持续再建（形成）。在成人期，骨重建对于清除结构上损坏或老化的骨并代之以结构上新的和健康的骨是关键的。为了维持合适的骨量，吸收和形成保持完美的平衡。随着年龄的增长，骨吸收和形成间的平衡发生变化，通常倾向于吸收，导致骨量减少、骨构造劣化、对应力的抗性下降、骨变脆及易于骨折。这些症状概称为骨质疏松。

破骨细胞是起侵蚀骨基质功能的大型多核细胞。它们与巨噬细胞和其它从单核细胞发生的细胞有关。像巨噬细胞一样，破骨细胞是从造血祖细胞衍生的。破骨细胞介导系统性和局灶性骨丢失。

骨基质侵蚀是与骨基质形成（成骨细胞参与的过程）协调发生的正常过程。本质上，破骨细胞侵蚀骨基质并在骨中形成孔道，成骨细胞随之覆盖该孔道壁，形成新的骨基质。典型的，在正常成人中，每年 5-10% 的骨通过这些过程得到更换。

骨质疏松是西方社会的一个重大健康问题，迄今为止是最流行的疾病且在保健方面花费最多。据估计在 45 岁以上的女性和男性中骨质疏松的风险分别为 85% 和 15%。在美国，据估计有 1700 万绝经后女性丢失了其骨量峰值的 10%，940 万丢失了 25%，还有 500 万患有骨质疏松所致的骨折。骨质疏松每年由于脊柱骨折和髌骨折给美国保健系统造成 140 亿美元以上的花费；如果该疾病未被诊断，脊柱骨折和髌骨折常常是它的第一指征。

骨质疏松典型的反映骨骼周转(turnover)中骨吸收超过骨形成的失衡。骨吸收是破骨细胞的特有功能；破骨细胞是多核、特化的骨细胞，由源自造血隔室(hemopoietic compartment)，更精确的说源自粒细胞-巨噬细胞集落形成单元(GM-CFU)的单个核祖细胞融合而形成。破骨细胞是吸收骨的主要细胞类型，并与骨形成细胞即成骨细胞一起控制骨量、骨形状和骨结构。破骨细胞的活性和/或数目相对于骨形成性成骨细胞的活性或数目的增加控制着骨质疏松和其它骨丢失疾病的发生。

尽管佩吉特病不如骨质疏松常见和费钱（其影响 40 岁以上人群中的 3%，80 岁以上人群中的 10%），但仍是一种重要的疾病，因为它在造成骨折以外还可导致严重的骨关节炎和严重的神经学病症。佩吉特病的特征在于快速骨周转，导致形成编织骨，一种最初在胚胎和生长过程中形成且在成人骨骼中实际上不存在的组织类型。编织骨的特点在于脆性，因此易于发生骨折和弯曲。骨发生扩大且常常妨碍血流及挤压神经，导致与佩吉特病有关的许多神经学症状。

对于其中破骨细胞可能以异常高的水平吸收骨而成骨细胞以正常水平形成骨的疾病，像骨质疏松中的那样，合理的治疗靶标将是破骨细胞：降低破骨细胞和数目和/或功能可能恢复吸收和形成之间的平衡。而且，事实上，现有的针对骨质疏松的治疗旨在抑制骨吸收。

破骨细胞衍生自单核细胞-巨噬细胞家族。在用巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)刺激 CFU-GM 后形成幼单核细胞，它们是单个核吞噬细胞和破骨细胞的未成熟、非粘附性祖先。根据它们接触到的细胞因子，幼单核细胞

可以沿着巨噬细胞途径增殖和分化, 最终形成组织巨噬细胞, 或者可以沿着破骨细胞途径分化。例如, 受体活化物 NF- κ B 配体(RANKL) (Simonet *et al. Cell* 89:309-319 (1997)), 一种在破骨细胞膜表面上表达的细胞因子, 影响幼单核细胞使之分化为破骨细胞而非巨噬细胞, 而 M-CSF 处理驱使幼单核细胞发育为巨噬细胞。由于 M-CSF 和其它支持 RANKL 表达的细胞因子例如白介素-1 或 TNF- α 是巨噬细胞的产物, 可以认为: 改变这些细胞因子和生长因子的表达的免疫调控性物质可能不仅影响巨噬细胞, 还影响破骨细胞。

骨质疏松有多种治疗药征, 包括二膦酸盐/酯(Fleisch H, "Development of biphosphonates", *Breast Cancer Res.* 4:30-34 (2002); Spencer C P, Stevenson J C, "Oestrogen and anti-oestrogen for the prevention and treatment of osteoporosis". 于《Osteoporosis: Diagnosis and Management》中, Martin Muniz, England, 1998, pp 111-123), 或“选择性雌激素受体调节物”(SERM)。

在影响成骨细胞、破骨细胞及其前体增殖、分化和活性的蛋白质中, 有许多也影响软骨细胞中的这些过程; 软骨细胞是负责软骨形成(软骨发生)的细胞。这些蛋白质包括血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、骨形态发生蛋白(BMP)和软骨衍生生长因子(CDGF)。

最近鉴定了一种名为“zveg3”的 PDGF 同源物, 它又称为“VEGF-R” (WIPO 公布 WO 99/37671)。zveg3/VEGF-R 是一种多结构域蛋白质, 与 PDGF/VEGF 生长因子家族具有显著同源性。发现 zveg3 可用于治疗某些骨病症, 诸如骨质疏松(见 US 2004/0043031 和美国专利 6,663,870)。

披露了一种从活的骨原细胞或牙原细胞生产的组合物, 用于投递抗炎多肽, 例如人白介素-4, 以构建或再建骨组织(见 US 2004/0126364)。

肿瘤坏死因子(TNF)家族的受体和配体最近显示出在破骨细胞的分化和活性中起关键作用, 因此在骨吸收中起作用。已知 TNF- α 促进破骨细胞发生(osteoclastogenesis), 即破骨细胞的产生。一种 TNF 样分子存在于破骨细胞和基质细胞上和/或由这两种细胞分泌, 在本领域中和本文中可互换称为“NF- κ B 配体的受体活化物”(RANKL)、“破骨细胞分化因子”(ODF)、“护骨蛋白配体”(OPGL)及“TNF 相关活化诱导的细胞因子”(TRANCE), 它与一种 TNF 受体样分子相互作用, 该 TNF 受体样分子在本领域和本文中称为“NF- κ B 配体的受体活化物”(RANKL), 它存在于破骨细胞前体和成

熟破骨细胞的膜中，调控破骨细胞发生和成熟破骨细胞的吸收活性。TNF 抑制剂诸如抗体被用来治疗类风湿性关节炎。Suda 等人(*Endocrine Reviews* 20(3):345-357 (1999))记载了破骨细胞的分化和功能。Filvaroff 和 Derynck (*Curr. Biol.* 8:R679-R682 (1998))提及了骨重建和破骨细胞调控的信号传导系统。另见 Goldring, *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 3(4):287-289 (2003); Goldring, *Rheumatology*, 42 Suppl 2, pii11-6 (May 2003); Goldring and Goldring, *Current Opinion in Orthopaedics*, 13(5):351-362 (2002); 及 Goldring, *Current Opinion in Rheumatology* 14(4):406-10 (2002)。另外，小鼠可发生的关节炎的炎性很强，但 RANKL/ODF 敲除小鼠并不发生骨侵蚀（如 Gravalles, “Bone destruction in arthritis” *Ann. Rheum. Dis.* 61 (suppl II): ii84-6 (2002)的综述）。

US 2004/0058889披露了用 β -葡聚糖治疗与骨丢失或低骨密度有关的疾患的方法，以及在期望增强骨生长的情况下促进骨生长的方法。

CD20 抗体和使用 CD20 抗体的疗法

淋巴细胞是在造血过程中在骨髓中生成的多种类型白细胞之一。有两种主要的淋巴细胞群：B 淋巴细胞（B 细胞）和 T 淋巴细胞（T 细胞）。本文特别感兴趣的淋巴细胞是 B 细胞。

B 细胞在骨髓中成熟，然后离开骨髓并在它们的细胞表面上表达抗原结合抗体。当幼稚 B 细胞初次遇到其膜结合抗体特异性的抗原时，细胞开始快速分裂，且其后代分化成为记忆 B 细胞和称做“浆细胞”的效应细胞。记忆 B 细胞具有较长的寿命，并继续表达与最初的亲本细胞具有相同特异性的膜结合抗体。浆细胞不生成膜结合抗体，但改为生成可分泌形式的抗体。分泌型抗体是体液免疫的主要效应分子。

CD20 抗原（也称做人 B 淋巴细胞限制分化抗原，Bp35）是位于前 B 淋巴细胞(pre-B)和成熟 B 淋巴细胞上、具有约 35kD 分子量的疏水性跨膜蛋白质。Valentine *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989)及 Einfeld *et al.*, *EMBO J.* 7(3):711-717 (1988)。该抗原还在超过 90%的 B 细胞非何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤(NHL)上表达(Anderson *et al.*, *Blood* 63(6):1424-1433 (1984))，但在造血干细胞、原 B 细胞(pro-B)、正常浆细胞或其它正常组织上没有发现(Tedder *et al.*, *J. Immunol.* 135(2):973-979 (1985))。CD20 调节细

胞周期起始和分化的激活过程的早期步骤(Tedder *et al.*, 见上文), 并可能发挥钙离子通道的功能(Tedder *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990))。

若 CD20 在 B 细胞淋巴瘤中表达, 则该抗原可用做“靶向”此类淋巴瘤的候选者。本质上, 这种靶向作用可概括如下: 对患者施用对 B 细胞 CD20 表面抗原特异的抗体。这些抗 CD20 抗体特异结合正常和恶性 B 细胞(表面上)的 CD20 抗原; 与 CD20 表面抗原结合的抗体可导致赘生性 B 细胞的破坏和消减。此外, 可将具有破坏肿瘤潜力的化学药剂或放射性标记物与抗 CD20 抗体偶联, 使得该药剂特异性“投递”至赘生性 B 细胞。不考虑方法, 首要目标是破坏肿瘤; 具体方法可根据所使用的具体抗 CD20 抗体来决定, 因此可利用的靶向 CD20 抗原的方法可能变化相当大。

rituximab 抗体(以 RITUXAN®在美国、以 MABTHER®在其它地方销售的产品中的活性剂)是针对 CD20 抗原的基因工程嵌合鼠/人单克隆抗体。rituximab 就是 1998 年 4 月 7 日公告的美国专利 5,736,137 (Anderson 等人)中称为“C2B8”的抗体。rituximab 指明用于治疗患有复发性或顽固性低级或滤泡性 CD20 阳性 B 细胞非何杰金氏淋巴瘤的患者。作用机制的体外研究表明 rituximab 结合人补体并通过补体依赖性细胞毒性(CDC)溶解淋巴样 B 细胞系。Reff *et al.*, *Blood* 83(2):435-445 (1994)。此外, 它在抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)测定法中具有显著活性。最近, rituximab 在鼠标记胸苷掺入测定法中显示出具有抗增殖效果并直接诱导凋亡, 而其它抗 CD19 和抗 CD20 抗体则不然。Maloney *et al.*, *Blood* 88(10):637a (1996)。在试验中还观察到 rituximab 与化学疗法和毒素之间的协同作用。具体而言, rituximab 使耐药性人 B 细胞淋巴瘤细胞系对多柔比星、CDDP、VP-16、白喉毒素和蓖麻毒蛋白的细胞毒性作用敏感(Demidem *et al.*, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186 (1997))。体内临床前研究显示 rituximab 从猕猴的外周血、淋巴结和骨髓中消减 B 细胞, 可能通过补体和细胞介导的过程。Reff *et al.*, *Blood* 83(2):435-445 (1994)。

美国在 1997 年 11 月批准将 rituximab 用于治疗患有复发性或顽固性低级或滤泡性 CD20 阳性 B 细胞 NHL 的患者, 每周一次, 一剂 375mg/m², 共四剂。2001 年 4 月, 食品和药品管理局(FDA)批准了用于治疗低级 NHL 的其它适应征: 复治(每周一次, 共四剂)和别的剂量给药方案(每周一次, 共八剂)。有超过 300,000 名患者接受了 rituximab, 或是作为单一疗法或是

联合免疫抑制剂或化疗药物。还已经作为维持疗法用 rituximab 治疗患者，可长达 2 年。Hainsworth *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 21:1746-1751 (2003); Hainsworth *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 20:4261-4267 (2002); Edwards *et al.*, "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis" *N. Engl. J. Med.* 350:2572-82 (2004)。

也已在 B 细胞和自身抗体表现出在疾病病理生理学中发挥作用的多种非恶性自身免疫性病症中研究了 rituximab。Edwards *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* 30: 824-828 (2002)。已有报导，rituximab 潜在减轻例如类风湿性关节炎(RA) (Leandro *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 61: 883-888 (2002); Edwards *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46(Suppl. 9): S46 (2002); Stahl *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 62(Suppl. 1): OP004 (2003); Emery *et al.*, *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003))、狼疮 (Eisenberg, *Arthritis Res. Ther.* 5:157-159 (2003); Leandro *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman *et al.*, *Lupus* 13: 312-316 (2004))、免疫性血小板减少性紫癜 (D'Arena *et al.*, *Leuk. Lymphoma* 44: 561-562 (2003); Stasi *et al.*, *Blood* 98: 952-957 (2001); Saleh *et al.*, *Semin. Oncol.* 27(Suppl. 12): 99-103 (2000); Zaia *et al.*, *Haematologica* 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn *et al.*, *Ann. Int. Med.* 133: 275-279 (2000))、纯红细胞再生障碍 (Auner *et al.*, *Br. J. Haematol.* 116: 725-728 (2002))、自身免疫性贫血 (Zaja *et al.*, *Haematologica* 87: 189-195 (2002), 勘误见 *Haematologica* 87: 336 (2002))、冷凝集素疾病 (Layios *et al.*, *Leukemia* 15: 187-8 (2001); Berentsen *et al.*, *Blood* 103: 2925-2928 (2004); Berentsen *et al.*, *Br. J. Haematol.* 115: 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.* 112: 1083-1090 (2001); Damiani *et al.*, *Br. J. Haematol.* 114: 229-234 (2001))、B 型重度胰岛素耐受综合征 (Coll *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 350: 310-311 (2004))、混合性冷球蛋白血症 (DeVita *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46 Suppl. 9: S206/S469 (2002))、重症肌无力 (Zaja *et al.*, *Neurology* 55: 1062-63 (2000); Wylam *et al.*, *J. Pediatr.* 143: 674-677 (2003))、韦格纳氏(Wegener)肉芽肿 (Specks *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001))、顽固性寻常型天疱疮 (Dupuy *et al.*, *Arch. Dermatol.* 140: 91-96 (2004))、皮炎 (Levine, *Arthritis Rheum.* 46(Suppl. 9): S1299 (2002))、斯耶格伦氏(Sjögren)综合征 (Somer *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 49: 394-398 (2003))、活动性 II 型混合性冷球蛋白血症 (Zaja *et*

al., *Blood* 101: 3827-3834 (2003))、寻常型天疱疮 (*Dupay et al.*, *Arch. Dermatol.* 140: 91-95 (2004))、自身免疫性神经病 (*Pestronk et al.*, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74: 485-489 (2003))、副肿瘤性视性眼阵挛-肌阵挛综合征 (*Pranzatelli et al.*, *Neurology* 60(Suppl. 1) PO5.128: A395 (2003))、以及复发-缓和型多发性硬化(RRMS) (*Cross et al.*, (abstract) "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS", 美国多发性硬化研究与治疗委员会第八次年会, 20-21 (2003)) 的征候和症状。

已在类风湿性关节炎(RA)患者中进行了 II 期研究 (WA16291), 提供了有关 rituximab 的安全性和功效的 48 周跟踪数据。Emery *et al.*, *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003); Szczepanski *et al.*, *Arthritis Rheum.* 48(9): S121 (2003)。将总共 161 名患者随机平分为四个治疗组: 甲氨喋呤、仅 rituximab、rituximab 加甲氨喋呤、以及 rituximab 加环磷酰胺(CTX)。rituximab 治疗方案为第 1 天和第 15 天静脉内施用 1 克。大多数 RA 患者对输注 rituximab 有很好的耐受, 有 36% 的患者在其首次输注期间发生至少一种不良事件 (与 30% 接受安慰剂的患者相比)。总之, 认为大多数不良事件在严重程度上是轻度至中度的, 而且所有处理组之间很平衡。在 48 周中四个组共有 19 例重度不良事件, 其中 rituximab/CTX 组略微更频繁一些。所有组之间的感染发生率很平衡。该 RA 患者群中严重感染的平均比率为每 100 患者-年 4.66, 低于基于社会的流行病学研究中所报告的 RA 患者中需要住院治疗的感染比率 (每 100 患者-年 9.57)。Doran *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46: 2287-2293 (2002)。

所报导的 rituximab 在少数神经学病症患者中的安全概况, 所述神经学病症包括自身免疫性神经病 (*Pestronk et al.*, 见上文)、视性眼阵挛-肌阵挛综合征 (*Pranzatelli et al.*, 见上文) 和 RRMS (*Cross et al.*, 见上文), 与在肿瘤学或 RA 中所报导的类似。正在 RRMS 患者中进行的 rituximab 联合干扰素- β (IFN- β) 或醋酸格拉默的研究者发起试验(IST) (*Cross et al.*, 见上文) 中, 接受治疗的 10 名患者中有 1 名在首次输注 rituximab 后发生中度发热和打寒战, 之后入院彻夜观察, 而其他 9 名患者完成了四次输注方案, 没有报告任何不良事件。

有关 CD20 抗体和 CD20 结合分子的专利和专利出版物包括美国专利 5,776,456、5,736,137、5,843,439、6,399,061 和 6,682,734, 以及 US

2002/0197255、US 2003/0021781、US 2003/0082172、US 2003/0095963、US 2003/0147885 (Anderson 等人); 美国专利 6,455,043 和 WO 2000/09160 (Grillo-Lopez,A.); WO 2000/27428(Grillo-Lopez 和 White); WO 2000/27433 (Grillo-Lopez 和 Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky 等人); WO 2001/10462(Rastetter,W.); WO 01/10461(Rastetter 和 White); WO 2001/10460 (White 和 Grillo-Lopez); US 2001/0018041、US 2003/0180292、WO 2001/34194(Hanna 和 Hariharan); US 2002/0006404 和 WO 2002/04021(Hanna 和 Hariharan); US 2002/0012665 和 WO 2001/74388 (Hanna,N.); US 2002/0058029 (Hanna,N.); US 2003/0103971 (Hariharan 和 Hanna); US 2002/0009444 和 WO 2001/80884 (Grillo-Lopez,A.); WO 2001/97858 (White,C.); US 2002/0128488 和 WO 2002/34790 (Reff,M.); WO 2002/060955 (Braslawsky 等人); WO 2002/096948 (Braslawsky 等人); WO 2002/079255 (Reff 和 Davies); 美国专利 6,171,586 和 WO 1998/56418 (Lam 等人); WO 1998/58964 (Raju,S.); WO 1999/22764 (Raju,S.); WO 1999/51642、美国专利 6,194,551、美国专利 6,242,195、美国专利 6,528,624 和美国专利 6,538,124(Idusogie 等人); WO 2000/42072(Presta,L.); WO 2000/67796 (Curd 等人); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez 等人); US 2002/0004587 和 WO 2001/77342 (Miller 和 Presta); US 2002/0197256 (Grewal,I.); US 2003/0157108(Presta,L.); 美国专利 6,565,827、6,090,365、6,287,537、6,015,542、5,843,398 和 5,595,721 (Kaminski 等人); 美国专利 5,500,362、5,677,180、5,721,108、6,120,767 和 6,652,852 (Robinson 等人); 美国专利 6,410,391(Raubitschek 等人); 美国专利 6,224,866 和 WO 00/20864 (Barbera-Guillem,E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem,E.); WO 2000/67795(Goldenberg); US 2003/0133930 和 WO 2000/74718(Goldenberg 和 Hansen); US 2003/0219433 和 WO 2003/68821 (Hansen 等人); WO 2004/058298 (Goldenberg 和 Hansen); WO 2000/76542 (Golay 等人); WO 2001/72333 (Wolin 和 Rosenblatt); 美国专利 6,368,596 (Ghetie 等人); 美国专利 6,306,393 和 US 2002/0041847 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner 和 Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar 等人); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, US2002/0009427,和 US 2003/0185796 (Wolin 等人); WO 2003/061694 (Sing

和 Siegall); US 2003/0219818 (Bohen 等人); US 2003/0219433 和 WO 2003/068821 (Hansen 等人); US 2003/0219818 (Bohen 等人); US2002/0136719 (Shenoy 等人); WO 2004/032828 (Wahl 等人); 和 WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter)。还参见美国专利 5,849,898 和 EP 330,191 (Seed 等人); EP332,865A2 (Meyer 和 Weiss); 美国专利 4,861,579 (Meyer 等人); US2001/0056066 (Bugelski 等人); WO 1995/03770 (Bhat 等人); US 2003/0219433 A1 (Hansen 等人); WO 2004/035607 (Teeling 等人); WO 2004/056312 (Lowman 等人); US 2004/0093621 (Shitara 等人); WO 2004/103404 (Watkins 等人); WO 2005/000901 (Tedder 等人); 和 US 2005/0025764 (Watkins 等人)。

有关使用 rituximab 的疗法的出版物包括: Perotta 和 Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab" 摘要#3360 *Blood* 10(1)(part 1-2): p. 88B (1998); Perotta 等人, "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopaenic purpura (ITP)", *Blood*, 94: 49 (abstract) (1999); Matthews, R., "Medical Heretics" *New Scientist* (7 April, 2001); Leandro 等人, "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis*, 同上; Leandro 等人, "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro 等人, "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis and Rheumatism*, 46:2673-2677 (2002), 其中在 2 周期间, 每名患者接受两次 500mg rituximab 输注、两次 750mg 环磷酰胺输注、和高剂量口服皮质类固醇, 且其中两名接受治疗的患者分别在第 7 和 8 个月时复发, 且已经用不同方案复治; "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" Weide 等人, *Lupus*, 12: 779-782 (2003), 其中用 rituximab 治疗一名患者 ($375\text{mg}/\text{m}^2 \times 4$, 每周重复一次), 并且每 5-6 个月投递更多的 rituximab 应用, 然后每三个月接受 $375\text{mg}/\text{m}^2$ rituximab 的维持疗法, 而且用 rituximab 成功的治疗了患有顽固性 SLE 的第二名患者, 且每三个月接受维持疗法, 两名患者对 rituximab 疗法都有较好的响应; Edwards 和 Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes"

Rheumatology 40:205-211 (2001); Cambridge 等人, "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S1350 (2002); Edwards 等人, "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem Soc. Trans.*, 同上; Edwards 等人, "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis" *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Edwards 等人, "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis," *N. Engl. J. Med.* 350:2572-82 (2004); Pavelka 等人, *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):289-90 (2004); Emery 等人, *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004); Levine 和 Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); DeVita 等人, "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002); Hidashida *et al.* "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." 发表于 *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; 10月24-29日; New Orleans, LA 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" 发表于 *the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; 10月24-29日; New Orleans, LA 2002; "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin 和 Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004); Silverman 和 Weisman, "Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz 和 Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004); Virgolini 和 Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases", *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58: 299-309(2004); Klemmer 等人, "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with a AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab", *Arthritis And Rheumatism* , 48: (9) 9,S (SEP), 第 S624-S624 页 (2003); Kneitz 等人, "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases", *Immunobiology*, 206: 519-527 (2002); Arzoo 等人,

"Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)" *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 (10), p922-4 (2002) *Comment in Ann Rheum Dis*. 61: 863-866 (2002); Lake 和 Dionne, "Future Strategies in Immunotherapy", 于 *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 中 (2003, John Wiley & Sons, Inc.), 文章在线发布日: 2003 年 1 月 15 日 (第二章"Antibody-Directed Immunotherapy"); Liang 和 Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, "CD20 as an Immunotherapy Target" 部分, 文章在线发布日: 2002 年 1 月 15 日, 题为 "CD20"; 附录 4A, 题为 "Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens", Stockinger 等人作, Coligan 等人编, 于 *Current Protocols in Immunology* 中(2003, John Wiley & Sons, Inc)在线发布日: 2003 年 5 月; 印刷公布日: 2003 年 2 月; Penichet 和 Morrison, "CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering" 于 *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* 中, "Chimeric, Humanized and Human Antibodies" 部分; 在线发表 2002 年 1 月 15 日; Specks 等人"Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44:2836-2840 (2001); 摘要在线投稿和约稿 Koegh 等人, "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", American College of Rheumatology, 期号 (Session Number): 28-100, 期题名 (Session Title): Vasculitis, 题类型 (Session Type): ACR Concurrent Session, 主门类 (Primary Category): 28 Vasculitis, 期 10/18/2004 (<www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson, "Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab", *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Jayne 等人, "B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis" *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology; Stone 和 Specks, "Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis", 于 the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network 中, <www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>。还

可见 Leandro 等人, "B cell repopulation occurs mainly from naïve B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus" *Arthritis Rheum.*, 48 (Suppl 9): S1160 (2003)。

B 淋巴细胞在破骨细胞形成中的作用还有争议, 因为 B 谱系细胞对破骨细胞发生和寿命的刺激作用和抑制作用都有报道。B 淋巴样谱系细胞可能以两种方式参与破骨细胞发生, 通过表达 ODF/RANKL 支持破骨细胞分化和充当破骨细胞祖先(Manabe *et al.*, *J. Immunol.*, 167(5):2625-2631 (2001))。护骨蛋白调节 B 细胞成熟以及骨代谢(Yun *et al.*, *J. Immunol.*, 166(3):1482-1491 (2001))。B 细胞显示出通过分泌转化生长因子- β (TGF- β) 抑制破骨细胞群的形成并缩短成熟破骨细胞群的寿命, TGF- β 是一种在上述细胞中诱导凋亡的因子(Weitzmann *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 78(2):318-324 (2000))。B 淋巴细胞祖先可产生功能性破骨细胞(Grcevic *et al.*, *Croatian Medical Journal*, 42(4):384-392 (2001))。

在二膦酸盐/酯的大鼠佐剂关节炎研究中, 依替膦酸盐/酯和氯膦酸盐/酯降低体重减轻、足部炎症和骨吸收(Flora *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 22:340-346 (1978))。NE58095 是一种二膦酸盐/酯, 其在实验关节炎中防止骨侵蚀并保护关节构造(Francis *et al.*, *Int. J. Tis. Res.*, 11:239-252 (1989))。唑来膦酸盐/酯在实验炎性关节炎中防止干骺端皮质内缺陷(Pysklwec *et al.*, *J. Orthop. Res.*, 15: 858-861 (1997))。氯膦酸盐/酯 20 mg/kg/日 静脉内输注减轻足部炎症和骨吸收, 但也抑制骨形成。Oelzner *et al.*, *Inflamm. Res.*, 49:424-433 (2000)。

所有得到批准的二膦酸盐/酯(帕米膦酸盐/酯、阿伦膦酸盐/酯、利塞膦酸盐/酯和唑来膦酸盐/酯)均改善骨吸收的生化指标(减少系统骨丢失), 并抑制局灶性骨侵蚀的发展。Gravallese, 同上。尽管可认为二膦酸盐/酯是减缓类风湿性关节炎中结构变化的潜在疗法, 然而功效、长期耐受性和毒性未知, 需要更多的试验。

虽然对生长因子在组织生长和修复中的作用的了解日益增长, 本领域仍然需要促进骨、韧带和软骨生长的材料和方法。还需要调控破骨细胞发生和成熟破骨细胞吸收活性的方法。还需要预防骨丢失和治疗骨疾病的方法。

发明概述

因此，本发明如权利要求所述。本发明涉及施用结合 B 细胞表面标志的拮抗剂，其在患有骨病症的受试者中提供安全和积极的治疗方案。

在第一个方面，本发明涉及治疗哺乳动物中的骨病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的 CD20 抗体。

在另一个方面，本发明涉及治疗哺乳动物中的骨病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的结合 B 细胞表面标志的抗体。

在又一个方面，本发明提供了治疗哺乳动物中的骨病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的结合 B 细胞表面标志的拮抗剂。

在又一个方面，本发明提供了制品，其包括：容器，其中装有 CD20 抗体或结合 B 细胞表面标志的抗体或拮抗剂；及印有治疗哺乳动物中的骨病症的说明书的包装插页，其中所述说明书指示对哺乳动物施用有效量的所述 CD20 抗体或结合 B 细胞表面标志的抗体或拮抗剂。在一个优选的实施方案中，所述制品还包括装有所述抗体之外的治疗用药剂的容器，还包括用该药剂治疗哺乳动物的说明书。

在本发明上述方面的优选实施方案中，骨病症是骨质疏松，或局灶性骨侵蚀，包括边缘性关节侵蚀和软骨下骨侵蚀（骨髓），骨缺损，儿童期特发性骨丢失，牙槽骨丢失，骨折，或骨质减少诸如近关节骨质减少，或者为与自身免疫病诸如类风湿性关节炎有关的骨丢失。在另一实施方案中，本发明提供了预防炎性关节炎诸如类风湿性关节炎中的侵蚀性骨病(erosive bone disease)的方法，包括对患有此类疾病的哺乳动物施用有效量的 CD20 抗体。本发明还包括治疗与自身免疫病（特别是类风湿性关节炎）或发生自身免疫病的风险无关的骨病症的方法。

在另一个优选的方面，对哺乳动物施用有效量的第二药物，其中所述 CD20 抗体或所述结合 B 细胞表面标志的抗体或拮抗剂是第一药物。该药物可以是一种或多种药物。更优选的，该第二药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂（诸如护骨蛋白、MMP 抑制剂、细胞因子诸如 IL-4、 β -葡聚糖、整联蛋白拮抗剂、降钙素、质子泵抑制剂、蛋白酶抑制剂、或二膦酸盐/酯（诸如利塞膦酸盐/酯、依替膦酸盐/酯、氯膦酸盐/酯、NE-58095、唑来膦酸盐/酯、帕米膦酸盐/酯或阿伦膦酸盐/酯）、免疫抑制剂、缓解疾病的抗风湿药物(DMARD)、细胞毒剂、非类固醇抗炎药物(NSAID)、激素、或其组合。在另一优选实施方案中，哺乳动物是人。抗体优选静脉内或皮下施用。

在上述最后各方案的另一优选实施方案中，所述哺乳动物先前从未用结合 B 细胞表面标志的抗体诸如 CD20 抗体治疗过，并且/或者除了结合 B 细胞表面标志的抗体，包括 CD20 抗体之外，没有对哺乳动物施用其它药物以治疗所述骨病症。

在其它方面，本发明提供了抑制哺乳动物中的骨质溶解的方法，包括向哺乳动物中导入分离的牙原细胞或骨原细胞，所述牙原细胞或骨原细胞包含编码结合 B 细胞表面标志的抗体、优选 CD20 抗体的核酸。若该细胞是牙原细胞，则所述哺乳动物可患有或有风险发生牙周炎或牙周病所致的牙槽骨丢失。在另一实施方案中，牙原细胞可施用于颌的下颌部分中的牙周韧带。

在另一实施方案中，若该细胞是骨原细胞，则可将其植入到所述哺乳动物的连接关节中，并可将其施用于胫骨内或股骨内。另外，所述抗体的表达可受抗生素化合物诸如四环素或四环素类似物的调控，且还可对所述哺乳动物施用米诺环素。优选系统施用所述抗生素化合物。

还可对处于此类状况的哺乳动物施用白介素-4 或肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抑制剂。另外，该哺乳动物可患有或有风险发生类风湿性关节炎或根尖周或软骨内骨丢失、人工关节颗粒诱发的骨质溶解、或溶骨性骨转移。

其中促进骨生长有益的疾患包括例如加强骨移植物，诱导椎骨连结，增强长骨延伸，增强脊椎动物例如哺乳动物（包括人）中面部重建、上颌重建和/或下颌重建后的骨愈合，等等。

不限于任一理论，通过本发明的方法实现的破骨细胞活性抑制可以是破骨细胞吸收机制的抑制作用的结果，或者可以是抑制从前体细胞募集的破骨细胞数目的结果，或者是两者的结合。在主要影响年长个体特别是绝经后女性的骨质疏松中，成骨细胞所致的骨形成变慢，骨吸收增加，这些是由于衰老过程而正常发生的现象。本文的方法尤其旨在增强成骨细胞形成，从而也增加骨形成。

附图简述

图 1A 是比较鼠 2H7 (SEQ ID NO:1)、人源化 2H7.v16 变体 (SEQ ID NO:2) 和人 κ 轻链亚类 I (SEQ ID NO:3) 各自的轻链可变域(V_L)氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7.v16 的 V_L 的 CDR 如下：CDR1 (SEQ ID NO:4)、CDR2

(SEQ ID NO:5)及 CDR3 (SEQ ID NO:6)。

图 1B 是比较鼠 2H7 (SEQ ID NO:7)、人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:8)和人重链 III 亚类共有序列(SEQ ID NO:9)各自的重链可变域(V_H)氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7.v16 的 V_H 的 CDR 如下: CDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11)及 CDR3 (SEQ ID NO:12)。

在图 1A 和图 1B 中, 每条链中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 加了方框, 侧翼为框架区, FR1-FR4, 如标示的。2H7 指鼠 2H7 抗体。两行序列之间的星号标示两种序列之间不同的位置。残基编号依照 Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 其中插入以 a、b、c、d 和 e 表示。

图 2 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:2)和人源化 2H7.v138 变体(SEQ ID NO:28)的轻链氨基酸序列的序列比对。

图 3 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:8)和人源化 2H7.v138 变体(SEQ ID NO:29)的重链氨基酸序列的序列比对。

实施方案详述

I. 定义

“B 细胞”指在骨髓中成熟的淋巴细胞, 包括幼稚 B 细胞、记忆 B 细胞和效应 B 细胞(浆细胞)。本文中 B 细胞可以是正常或非恶性的 B 细胞。

“B 细胞表面标志”或“B 细胞表面抗原”在本文中指在 B 细胞表面上表达、可用结合它的拮抗剂靶向它的抗原。例示性 B 细胞表面标志包括 CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85 和 CD86 白细胞表面标志(描述参见《The Leukocyte Antigen Facts Book》, 第 2 版, 1997, Barclay 等人编, Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)。其它 B 细胞表面标志包括 RP105、FcRH2、B 细胞 CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Bt_{ig}、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA 和 239287。特别感兴趣的 B 细胞表面标志在 B 细胞上较之哺乳动物的其它非 B 细胞组织优先表达, 且可在前体 B 细胞和成熟 B 细胞二者上表达。本文中优选的 B 细胞表面标志是 CD20 和

CD22。

“CD20”抗原，或“CD20”，是在超过90%来自外周血或淋巴样器官的B细胞表面上发现的约35kDa的非糖基化磷蛋白。CD20存在于正常B细胞以及恶性B细胞二者上，但在干细胞上不表达。CD20在文献中的其它名称包括“B淋巴细胞限制抗原”和“Bp35”。CD20抗原记载于例如Clark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 82: 1766 (1985)。

“CD22”抗原，或“CD22”，也称为BL-CAM或Lyb8，是分子量约130（缩短的）至140kD（未缩短的）的1型整合膜糖蛋白。它在B淋巴细胞的细胞质和细胞膜二者中表达。CD22抗原在B细胞淋巴细胞分化的早期出现，大约在与CD19抗原相同的阶段。与其它B细胞标志不同，CD22膜表达局限于成熟B细胞（CD22+）和浆细胞（CD22-）之间包含的分化晚期。CD22抗原记载于例如Wilson *et al.*, *J. Exp. Med.* 173: 137 (1991)和Wilson *et al.*, *J. Immunol.* 150: 5013 (1993)。

“拮抗剂”指在结合B细胞上的CD20后破坏或消减哺乳动物中的B细胞和/或干扰一种或多种B细胞功能（例如通过降低或阻止由B细胞引发的体液应答）的分子。优选的是，拮抗剂能够在用其处理的哺乳动物中消减B细胞（即降低循环中的B细胞水平）。这种消减可通过各种机制来实现，诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)、抑制B细胞增殖、和/或诱导B细胞死亡（如通过凋亡）。本发明范围内所包括的拮抗剂包括结合CD20的抗体、合成或天然序列肽、免疫粘附素、和小分子拮抗剂，任选与细胞毒剂偶联或融合。优选的拮抗剂包括抗体。

“抗体拮抗剂”在本文中指在结合B细胞上的B细胞表面标志后破坏或消减哺乳动物中的B细胞和/或干扰一种或多种B细胞功能（例如通过降低或阻止由B细胞引发的体液应答）的抗体。优选的是，抗体拮抗剂能够在用其处理的哺乳动物中消减B细胞（即降低循环中的B细胞水平）。这种消减可通过各种机制来实现，诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)、抑制B细胞增殖、和/或诱导B细胞死亡（如通过凋亡）。

术语“抗体”在本文中使用其最广的含义，具体覆盖单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体（例如双特异性抗体）、

及抗体片段，只要它们展示期望生物学活性。该定义中包括半衰期增长并更好的结合新生儿 Fc 受体(FcRn)的抗体，其中新生儿 Fc 受体负责将母体 IgG 转移给胎儿(Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976)和 Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994))；这些抗体记载在 WO00/42072 并 US2005/0014934A1 中。这些抗体所包含的 Fc 区中具有一处或多处替代，这些替代改善该 Fc 区对 FcRn 的结合。优选的 FcRn 结合改善的含 Fc 区抗体变体在其 Fc 区的一个、两个或三个位置上包含氨基酸替代。

“抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选包含其抗原结合区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

为本发明的目的，“完整抗体”指具有重链和轻链可变域以及 Fc 区的抗体。

“结合 B 细胞表面标志的抗体”指这样的分子，其在结合 B 细胞表面标志后破坏或消减哺乳动物中的 B 细胞和/或干扰一种或多种 B 细胞功能（例如通过降低或阻止由 B 细胞引发的体液应答）。优选的是，所述抗体能够在用其处理的哺乳动物中消减 B 细胞（即降低循环中的 B 细胞水平）。这种消减可通过各种机制来实现，诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)、抑制 B 细胞增殖、和/或诱导 B 细胞死亡（例如通过凋亡）。在一个优选的实施方案中，所述抗体诱发主要临床响应(major clinical response)。在另一个优选的实施方案中，所述 B 细胞表面标志是 CD20 或 CD22，因此结合 B 细胞表面标志的抗体是分别结合 CD20 或 CD22 的抗体，或者说分别是“CD20 抗体”或“CD22 抗体”。CD22 抗体的例子包括 EP 1,476,120 (Tedder and Tuscano)、EP 1,485,130 (Tedder)和 EP 1,504,035 (Popplewell *et al.*)中记载的那些，以及 US 2004/0258682 (Leung *et al.*)中记载的那些。在更优选的实施方案中，所述抗体是 CD20 抗体。一个特别优选的实施方案是诱发主要临床响应的 CD20 或 CD22 抗体，优选是 CD20 抗体。为本文的目的，“主要临床响应”定义为连续 6 个月实现 ACR70 (American College of Rheumatology 70 response, 美国风湿病学会 70 响应)。ACR 响应分数分为 ACR 20, ACR 50 和 ACR 70，其中 ACR70 是该评价系统中征候和症状控制的最高水平。ACR 响应分数衡量类风湿性关节炎疾病活动的改善，包括关节肿胀和压痛、疼痛、失能水

平和总体患者及内科医师评价。另一类型的诱发 FDA 承认且如本文定义的主要临床响应的抗体的例子是依那西普(etanercept) (ENBREL[®])。

CD20 抗体的例子包括：“C2B8”，现称“rituximab” (RITUXAN[®]/MABTHERA[®]) (美国专利 5,736,137); 名为“Y2B8”或“Ibritumomab Tiuxetan” (ZEVALIN[®])的钇-[90]标记的 2B8 鼠抗体，可购自 Biogen Idec Inc. (美国专利 5,736,137; 2B8 于 1993 年 6 月 22 日保藏于 ATCC, 编号 HB11388); 鼠 IgG2a “B1”，又称“Tositumomab”，任选用 ¹³¹I 标记产生“¹³¹I-B1”或“碘 131 tositumomab”抗体(BEXXAR[™]), 其可购自 Corixa (又见美国专利 5,595,721); 鼠单克隆抗体“1F5” (Press *et al. Blood* 69(2):584-591 (1987))及其变体，包括“修补了框架的”(framework patched)或人源化的 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC 保藏物 HB-96450); 鼠 2H7 和嵌合 2H7 抗体(美国专利 5,677,180); 人源化 2H7 (WO 2004/056312 (Lowman *et al.*)及如下述的); HUMAX-CD20[™]全人源、高亲和力抗体，靶向 B 细胞细胞膜中的 CD20 分子(Genmab, Denmark; 见例如 Glennie 和 van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003)及 Cragg *et al., Blood* 101: 1045-1052 (2003)); WO 2004/035607 (Teeling *et al.*)中列出的人单克隆抗体; US 2004/0093621 (Shitara *et al.*)中记载的 Fc 区结合了复杂 N-糖苷连接糖链的抗体; 结合 CD20 的单克隆抗体和抗原结合片段, 诸如 HB20-3、HB20-4、HB20-25 和 MB20-11 (WO 2005/000901, Tedder *et al.*); CD20 结合分子, 诸如 AME 系列抗体, 例如 WO 2004/103404 (Watkins *et al., Applied Molecular Evolution*)中列出的 AME-33[™] 抗体; CD20 结合分子, 诸如 US 2005/0025764 (Watkins *et al.*)中记载的那些; A20 抗体或其变体, 诸如嵌合或人源化 A20 抗体 (分别为 cA20、hA20) (US 2003/0219433, Immunomedics); 及可获自 International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al., 于 Leukocyte Typing III 中* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)))的单克隆抗体 L27、G28-2、93-1B3、B-C1 或 NU-B2。本文中优选的 CD20 抗体是嵌合的、人源化的或人的 CD20 抗体, 更优选 rituximab、人源化 2H7、嵌合或人源化 A20 抗体 (Immunomedics)、和 HUMAX-CD20[™] 人 CD20 抗体(Genmab)。

术语“rituximab”或“RITUXAN[®]”在本文中针对 CD20 抗原的遗传工程嵌合鼠/人单克隆抗体, 在美国专利 5,736,137 中称作“C2B8”，包括其保持结合 CD20 能力的片段。

纯粹为了本发明且除非另有说明,“人源化 2H7”指人源化 CD20 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体在体内有效消减灵长类 B 细胞,该抗体在其重链可变区(V_H)中至少包含 SEQ ID NO:12 (图 1B)所示的来自抗人 CD20 抗体的 CDR H3 序列和基本上人重链亚型 III (V_HIII)的人共有框架(FR)残基。在一个优选的实施方案中,该抗体还包含 SEQ ID NO:10 所示的 H 链 CDR H1 序列和 SEQ ID NO:11 所示的 CDR H2 序列,更优选还包含 SEQ ID NO:4 所示的 L 链 CDR L1 序列、SEQ ID NO:5 所示的 CDR L2 序列、SEQ ID NO:6 所示的 CDR L3 序列和基本上人轻链亚型 I (VI)的人共有框架(FR)残基,其中 V_H区可连接人 IgG 链恒定区,其中该区域可以是例如 IgG1 或 IgG3。还可见 WO 2004/056312 (Lowman *et al.*)。

在一个优选的实施方案中,此类抗体包含 SEQ ID NO:8 所示的 V_H序列 (v16, 如图 1B 所示), 任选还包含 SEQ ID NO:2 所示的 V_L序列 (v16, 如图 1A 所示), 其可在 H 链中具有氨基酸取代 D56A 和 N100A, 在 L 链中具有氨基酸取代 S92A(v96)。优选的是,抗体是包含分别如 SEQ ID NO:13 和 14 所示的轻链及重链氨基酸序列的完整抗体 2H7.v16。在另一个优选的实施方案中,所述抗体是包含分别如 SEQ ID NO:13 和 15 所示的轻链及重链氨基酸序列的完整抗体 2H7.v31。本文中的抗体可进一步在 Fc 区中包含至少一处改善 ADCC 和/或 CDC 活性的氨基酸取代,诸如其中氨基酸取代是 S298A/E333A/K334A 的抗体,更优选具有 SEQ ID NO:15 所示重链氨基酸序列的 2H7.v31。在另一优选的实施方案中,所述抗体是 2H7.v138,其包含分别如 SEQ ID NO:28 和 29 所示的轻链和重链氨基酸序列,如图 2 和 3 所示;图 2 和 3 是这些序列与 2H7.v16 的相应轻链及重链氨基酸序列的比对。或者,所述优选的完整人源化 2H7 抗体是 2H7.v477,它具有 2H7.v138 的轻链和重链序列,只是还具有氨基酸取代 N434W。上述任何序列均可在 Fc 区中进一步包含至少一处降低 CDC 活性的氨基酸取代,例如至少包含取代 K322A。参见美国专利 6,528,624B1 (Idusogie *et al.*)。

有些优选的人源化 2H7 变体是具有 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变域和 SEQ ID NO:8 所示的重链可变域的那些变体,即在 Fc 区中有或者没有取代的那些变体,和具有 SEQ ID NO:8 中带有改变 N100A 或 D56A/N100A 的重链可变域及 SEQ ID NO:2 中带有改变 M32L、或 S92A、或 M32L/S92A 的轻链可变域的那些变体,即在 Fc 区中有或者没有取代的那些变体。如果取代

发生在Fc区中,那么它们优选是下表中列出的那些取代之一。

总结本发明的一些不同优选实施方案可知,基于2H7第16型的变体的V区将具有v16的氨基酸序列,除了在下表中指出的氨基酸取代位置之外。除非另有说明,2H7变体将具有与v16相同的L链。

2H7 型式	重链(V _H) 改变	轻链(V _L) 改变	Fc 改变
16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L

特别优选的人源化2H7是包含如下可变轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

和如下可变重链序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS
(SEQ ID NO:8).

的完整抗体或抗体片段。

若人源化2H7抗体是完整抗体,优选其包含轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

和重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

或重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15).

在另一优选实施方案中,完整人源化 2H7 抗体包含轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28)

和重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQ
KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSASYWFYFDVWGQGTLLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:29).

在另一优选实施方案中,人源化 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:30 的轻链可
变区(V_L)序列和 SEQ ID NO:8 的重链可变区(V_H)序列,其中该抗体还在
VH-CDR2 中含有氨基酸取代 D56A,且 VH-CDR3 中的 N100 取代为 Y 或
W,其中 SEQ ID NO:30 具有序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:30).

在上面最后一种人源化 2H7 抗体的一个实施方案中, N100 取代为 Y。在另一个实施方案中, N100 取代为 W。另外, 在另一个实施方案中, 所述抗体在 VH-CDR3 中包含取代 S100aR, 优选还在 Fc 区中包含至少一处改善 ADCC 和/或 CDC 活性的氨基酸取代, 诸如所含 IgG1 Fc 包含氨基酸取代 S298A, E333A, K334A, K326A 的抗体。或者, 所述抗体在 VH-CDR3 中包含取代 S100aR, 优选还在 Fc 区中包含至少一处改善 ADCC 但降低 CDC 活性的氨基酸取代, 诸如至少包含氨基酸取代 K322A 的抗体, 以及还包含氨基酸取代 S298A、E333A、K334A 的抗体。

在一个特别优选的实施方案中, 抗体包含 2H7.v511 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

和 2H7.v511 重链:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGTLLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNATYRVVSVLTTLVHQQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 32).

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应, 其中表达 Fc 受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体, 随后引起靶细胞溶解。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞, 只表达 FcγRIII, 而单核细胞表达 FcγRI、FcγRII 和 FcγRIII。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991)第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性, 可进行体外 ADCC 测定法, 诸如美国专利第 5,500,362 或 5,821,337 号中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外, 可在体内评估目的分子的

ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998)中所披露的。

“人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行使效应器功能的白细胞。优选的是,该细胞至少表达 Fc γ RIII 并行使 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞,优选 PBMC 和 NK 细胞。

术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体),包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”)和 Fc γ RIIB (“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,区别主要在于其胞质结构域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997))。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-341 (1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR,包括那些未来将会鉴定的。该术语还包括新生儿受体, FcRn,它负责将母体 IgG 转移给胎儿(Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976)和 Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994))。

“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体时分子溶解靶物的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分(C1q)结合与相关抗原复合的分子(例如抗体)起始的。为了评估补体激活,可进行 CDC 测定法,例如如 Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)中所记载的。

“生长抑制性”抗体指那些阻止或降低表达抗体所结合的抗原的细胞增殖的抗体。例如,所述抗体可在体外和/或在体内阻止或降低 B 细胞增殖。

“诱导凋亡”的抗体指根据标准凋亡测定法诸如膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂、和/或膜囊(称作凋亡小体)形成的测定,诱导程序性细胞死亡,例如 B 细胞的程序性细胞死亡的抗体。

“天然抗体”指通常由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间有变化。每条重

链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在一端具有一个可变域(V_H)，接着是多个恒定域(C_H)。每条轻链在一端具有一个可变域(V_L)，而另一端是一个恒定域(C_L)；轻链的恒定域与重链的第一恒定域排列在一起，而轻链的可变域与重链的可变域排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变域之间形成界面。

术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体序列间差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而，变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作高变区的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR，它们大多采取 β -折叠片构象，通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起，并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成（参见Kabat等人，《Sequences of Proteins of Immunological Interest》，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991）。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应器功能，诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，各自具有一个抗原结合位点，和一个残余“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段，它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

“Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。此区由紧密、非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是在这种构造中，各可变域的三个高变区相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面上确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单个可变域（或只包含对抗原特异的三个高变区的半个Fv）也具有识别和结合抗原的能力，只是亲和力低于完整结合位点。

Fab片段还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH_1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于重链 CH_1 结构域的羧基末端增加了少数残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的Fab'的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初

是作为在 Fab' 片段之间有铰链半胱氨酸的成对 Fab' 片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

根据其恒定域氨基酸序列，来自任何脊椎动物物种的抗体（免疫球蛋白）“轻链”可归入两种截然不同类型中的一种，称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

根据其重链恒定域氨基酸序列，抗体可归入不同的类。抗体有五种主要的类：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中有些可进一步分为亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将与抗体的不同类对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域，其中这些结构域存在于一条多肽链上。优选的是，Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头，使得 scFv 能够形成结合抗原的期望结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun，在《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》中，第 113 卷，Rosenburg 和 Moore 编，Springer-Verlag, New York，第 269-315 页，1994。

术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段，该片段在同一条多肽链（ V_H - V_L ）中包含相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对，迫使结构域与另一条链的互补结构域配对，产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的记载于例如 EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同和/或结合相同表位，除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的可能变体外，此类变体通常以极小量存在。此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体，其中结合靶物的多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择结合靶物的单一多肽序列在内的过程得到的。例如，选择过程可以从众多克隆诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组 DNA 克隆的集合中选择独特克隆。应当理解，选择的结合靶物的序列可进一步改变，例如提高对靶物的亲和力、将结合靶物的序列人源化、提高其在细胞培养物中的产量、降低其在体内的免疫原性、创建多特异性抗体等，而且包含改变后的结合靶物的序列的抗体也是本发明的单克

隆抗体。与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性外，单克隆抗体制备物的优势在于它们未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如，将依照本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成，包括例如杂交瘤法（例如 Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988; Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681, Elsevier, N.Y., 1981）、重组 DNA 法（参见例如美国专利第 4,816,567 号）、噬菌体展示技术（参见例如 Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004))、及用于在具有部分或整个编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因座或基因的动物中生成人或人样抗体的技术（参见例如 WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.* 7: 33 (1993); 美国专利第 5,545,806 号; 第 5,569,825 号; 第 5,591,669 号（都属于 GenPharm）; 第 5,545,807 号; WO 1997/17852; 美国专利第 5,545,807 号; 第 5,545,806 号; 第 5,569,825 号; 第 5,625,126 号; 第 5,633,425 号; 第 5,661,016 号; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995))。

单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望生物学活性（美国专利第 4,816,567 号; Morrison *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类(例如旧大陆猴类(Old World Monkey), 诸如狒狒、恒河猴或猕猴)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体(美国专利 5,693,780)。

非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域,其中整个或基本上整个高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且除了上述FR取代以外,整个或基本上整个FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区,通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)。

术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变域中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2)和 89-97 (L3)及重链可变域中的残基 31-35 (H1)、50-65 (H2)和 95-102 (H3); Kabat 等人,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)和/或那些来自“高变环”的残基(例如轻链可变域中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2)和 91-96 (L3)及重链可变域中的残基 26-32 (H1)、53-55 (H2)和 96-101 (H3); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987))。“框架”或“FR”残基指可变域中那些此处定义的高变区残基以外的残基。

“裸抗体(裸露的抗体)”指未偶联异源分子,诸如细胞毒性部分或放射性标记物的抗体。

“分离的”抗体指已经鉴定且与/由其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指会干扰该抗体的诊断或治疗用途的

物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中，将抗体纯化至 (1) 根据 Lowry 法的测定，抗体重量超过 95%，最优选重量超过 99%，(2) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度，或 (3) 根据使用考马斯蓝或优选银染色的还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE，达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而，分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

为了治疗的目的，“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物，包括人，家畜和牲畜，及动物园、运动或宠物动物，诸如犬、马、猫、牛等。优选的是，哺乳动物指人。这样的哺乳动物是符合接受骨病症治疗条件的受试者，包括患者，其正经历或经历了骨病症的一种或多种征候、症状或其它指征，已诊断为患有骨病症，无论例如是新近诊断的或先前诊断而现在经历反复(recurrence)或复发(relapse)的，或是有发生骨病症风险的。所述哺乳动物先前可接受过 CD20 抗体治疗或者没有如此治疗过。任选的是，符合治疗骨病症条件的哺乳动物可鉴定为通过筛查的哺乳动物，正如血液中浸润 CD20 细胞水平升高。

哺乳动物的“处理”和“治疗”(treatment)指治疗性处理和防范性或预防性措施二者。需要治疗的受试者包括那些早就患有骨病症的以及要预防骨病症的。因此，所述哺乳动物可能已经诊断为患有骨病症或者可能有患上骨病症的倾向性或易感性。术语“治疗”或“处理”在用于本文时包括预防性（例如防病性）、减轻性和治愈性的治疗或处理。本发明的方法导致骨形成，结果降低骨折率。通过提供增加骨形成从而防止、阻滞和/或消退骨质疏松及相关骨病症的方法，本发明对本技术领域作出了显著的贡献。

骨病症的“症状”指哺乳动物所经历的结构、功能或感觉方面的任何病态现象或相对于正常的偏离，它是疾病，诸如上文所述那些疾病的指征。

短语“治疗破骨细胞相关病症的药剂”指可用于抑制、预防、治疗或减少本文所定义的骨病症的症状的任何分子。例子包括生长因子和其它对骨或结缔组织生长有积极效果的治疗剂，诸如生长因子包括胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)、PDGF、 α -转化生长因子(TGF- α)抑制剂、 β -转化生长因子(TGF- β)、表皮生长因子(EGF)、骨形态发生蛋白、白血病抑制因子、成纤维细胞生长因子、细胞因子诸如白介素-4 (IL-4)及 US 2004/0126364 中所记载

的 IL-4 突变体、如 US 2004/0043031 和美国专利 6,663,870 中所记载的 zvegf3 蛋白及 zvegf4 蛋白、以及其它治疗剂，包括维生素 D、二磷酸盐/酯、降钙素、雌激素、甲状旁腺素、成骨蛋白、NaF、护骨蛋白、他汀类药物、如美国专利 6,682,739B1 和 6,673,771B1 中所记载的有效抑制破骨细胞骨侵蚀活性的 TRANCE/RANK 抑制剂、如 US2004/0058889 中所记载的用于治疗骨质疏松和其它骨吸收疾病的 β 葡聚糖、本领域已知对骨形成有益的一种或多种化合物诸如钙、氟、镁、硼或其组合；如美国专利 6,660,728 中所记载的作为骨吸收抑制剂和玻连蛋白受体拮抗剂的噻吩基取代的酰基胍；如美国专利 6,602,878 中所记载的酰基胍衍生物；选自乙醇酸、乳酸、胶原、脱矿质骨或其组合的基质。上述基质的一部分上附着有包含纤连蛋白的第一生物学活性分子，以推动成骨细胞活性并促进骨形成增加。如 US 2003/0219429 中所记载的，基质的一部分上还附着有包含玻连蛋白的第二生物学活性分子，其中选择玻连蛋白是因为它能够吸引破骨细胞并对破骨细胞活性产生抑制作用从而促进骨吸收减少；血纤维蛋白溶酶原活化物抑制剂，其分两类。这两类是 SERPIN（丝氨酸蛋白酶抑制剂）和微管连接蛋白 I。SERPIN 类中有两种类型的抑制剂，即 PAI-1 和 PAI-2。PAI-1 以潜伏(latent)和活性两种形式存在；蛋白聚糖；纤连蛋白和纤连蛋白片段；玻连蛋白和玻连蛋白片段；胶原和胶原片段；肝素和肝素片段；冯 维勒布兰德(von Willebrand)因子；骨涎蛋白；骨桥蛋白；骨粘连蛋白；骨钙蛋白；选择蛋白和选择蛋白片段；推动细胞粘附的蛋白质和肽（包括环状型式）；RGD 型(Arg-Gly-Asp)和 GPR (Gly-Pro-Arg)等；GHK 型(Gly-His-Lys)等；层粘连蛋白和层粘连蛋白片段等；EIL 型(Glu-Ile-Leu 等；LDV 型(Leu-Asp-Val)、LDV-NH₂ (Leu-Asp-Val-NH₂)等；含有 RGD 或 GHK 氨基酸序列的合成肽；骨粘连蛋白和 SPARC（酸性且富含半胱氨酸的分泌型蛋白质）；骨桥蛋白；胶原，I 型和 II 型；冯 维勒布兰德(von Willebrand)因子（一种推动细胞对结构的粘附的糖蛋白。其能够连接至细胞，因此有潜力充当成骨细胞细胞表面受体的配体）；骨涎蛋白；血小板反应蛋白；骨钙蛋白；cytomodulin；骨形态发生蛋白(BMP)；生腱蛋白；纤维蛋白溶解抑制因子；生长因子，例如血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子(IGF)等；针对细胞表面组分例如 β -1 的抗体；整联蛋白抗体；纤溶酶原活化物抑制剂(PAI)；蛋白酶抑制剂；和金属蛋白酶抑制剂。（在上面的描述中采用常规的标记：R=Arg,

G=Gly, D=Asp, S=Ser, C=Cys, V=Val, E=Glu, A=Ala, P=Pro, K=Lys, T=Thr, Y=Tyr, Q=Gln, H=His, L=Leu, I=Ile, F=Phe。)优选护骨蛋白、白介素、MMP抑制剂、 β 葡聚糖、整联蛋白拮抗剂、降钙素、质子泵抑制剂、蛋白酶抑制剂、二膦酸盐/酯、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、转化生长因子- α 抑制剂、转化生长因子- β 、骨形态发生蛋白、甲状旁腺素、护骨蛋白、成纤维细胞生长因子、维生素 D、钙、氟、镁或硼、玻连蛋白、纤溶酶原激活物抑制剂、或蛋白酶抑制剂诸如金属蛋白酶抑制剂。更优选的是其中所述药剂是细胞因子或二膦酸盐/酯。

术语“免疫抑制剂”在本文中用于辅助疗法时指起抑制或掩盖本文中所治疗哺乳动物的免疫系统的作用的物质。这将包括抑制细胞因子生成、下调或抑制自身抗原表达、或掩盖 MHC 抗原的物质。此类药剂的例子包括 2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶（见美国专利 4,665,077）；非类固醇抗炎药物 (NSAID)；更昔洛韦(ganciclovir)、他克莫司(tacrolimus)、糖皮质激素诸如皮质醇(cortisol)或醛甾酮(aldosterone)、抗炎剂诸如环加氧酶抑制剂、5-脂加氧酶抑制剂、或白三烯受体拮抗剂；嘌呤拮抗剂，诸如硫唑嘌呤(azathioprine)或霉酚酸吗乙酯(mycophenolate mofetil, MMF)；烷化剂，诸如环磷酰胺(cyclophosphamide)；溴隐亭(bromocryptine)；达扎唑(danazol)；氨苯砒(dapsone)；戊二醛（如美国专利 4,120,649 中所记载的，它掩盖 MHC 抗原）；针对 MHC 抗原和 MHC 片段的抗独特型抗体；环孢菌素 A；类固醇，诸如皮质类固醇或糖皮质类固醇或糖皮质激素类似物，如泼尼松(prednisone)、甲泼尼龙(methylprednisolone)，包括 SOLU-MEDROL[®]甲泼尼龙琥珀酸钠，和地塞米松(dexamethasone)；二氢叶酸还原酶抑制剂，诸如甲氨喋呤(methotrexate)（口服或皮下）；抗疟剂诸如氯喹和羟氯喹；柳氮磺吡啶(sulfasalazine)；来氟米特(leflunomide)；细胞因子抗体或细胞因子受体抗体，包括抗干扰素- α 、- β 或- γ 抗体、抗肿瘤坏死因子(TNF)- α 抗体（infliximab (REMICADE[®])或 adalimumab）、抗 TNF- α 免疫粘附素（依那西普(etanercept)）、抗 TNF- β 抗体、抗白介素-2 (IL-2)抗体和抗 IL-2 受体抗体，及抗白介素-6 (IL-6)受体抗体和拮抗剂；抗 LFA-1 抗体，包括抗 CD11a 和抗 CD18 抗体；抗 L3T4 抗体；异源抗淋巴细胞球蛋白；泛(pan) T 抗体，优选抗 CD3 或抗 CD4/CD4a 抗体；含有 LFA-3 结合域的可溶性肽（90 年 7 月 26 日公布的 WO 90/08187）；链激酶；转化生长因子- β (TGF- β)；链道酶；来自宿主的

RNA 或 DNA; FK506; RS-61443; 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 脱氧精脒菌素(deoxyspergualin); 雷帕霉素(rapamycin); T 细胞受体 (Cohen 等人, 美国专利 5,114,721); T 细胞受体片段 (Offner et al., Science 251: 430-432 (1991); WO 1990/11294; Ianeway, Nature 341: 482 (1989); WO 91/01133); BAFF 拮抗剂诸如 BAFF 抗体和 BR3 抗体和 zTNF4 拮抗剂 (综述可参见 Mackay and Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002), 另见下文定义); 干扰 T 辅助细胞信号的生物剂, 诸如抗 CD40 受体或抗 CD40 配体 (CD154), 包括针对 CD40-CD40 配体的阻断性抗体 (例如 Durie et al., Science, 261: 1328-30 (1993); Mohan et al., J. Immunol., 154: 1470-80 (1995)) 和 CTLA4-Ig (Finck et al., Science, 265: 1225-7 (1994)); 及 T 细胞受体抗体 (EP 340,109), 诸如 T10B9。本文中的一些优选免疫抑制剂包括环磷酰胺、苯丁酸氮芥、硫唑嘌呤、来氟米特、MMF 或甲氨喋呤。

术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素 (例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu 的放射性同位素)、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素, 或其片段。

“化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类(alkylating agents), 诸如塞替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide) (CYTOXAN®); 磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates), 诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶类(aziridines), 诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredepa); 乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines), 包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类(acetogenins) (尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚(dronabinol), MARINOL®); β -拉帕醌(lapachone); 拉帕醇(lapachol); 秋水仙素类(colchicines); 白桦脂酸(betulinic acid); 喜树碱(camptothecin) (包括合成类似物托泊替康(topotecan) (HYCAMTIN®)、CPT-11 (伊立替康(irinotecan), CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和 9-氨基喜树碱); 苔藓抑素(bryostatin);

callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物); 鬼臼毒素(podophyllotoxin); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 替尼泊苷(teniposide); 隐藻素类(cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀(dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素(eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素(spongistatin); 氮芥类(nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝脲类(nitrosoureas), 诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素(enediyne) (例如加利车霉素(calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.* 33: 183-186 (1994))); dynemicin 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素(esperamicin); 以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(anthramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin) (包括 ADRIAMYCIN®、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂(Doxil®)和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素 C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨喋呤、吉西他

滨 (gemcitabine) (Gemzar®)、替加氟 (tegafur) (Uftoral®)、卡培他滨 (capecitabine) (Xeloda®)、埃坡霉素(epothilone)和 5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氧喋呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫鸟嘌呤(thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸(frolic acid); 醋葡醛内酯(aceglatone); 醛磷酸胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶(eniluracil); 安吡啶(amsacrine); bestabucil; 比生群(bisantrene); 依达曲沙(edatraxate); 地磷酰胺(defosfamide); 地美可辛(demecolcine); 地吡醌(diaziquone); elfornithine; 依利醋铵(elliptinium acetate); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟脲(hydroxyurea); 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 美登木素生物碱类(maytansinoids), 诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin); 米托胍脲(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 二胺硝吡啶(nitracrine); 喷司他丁(pentostatin); 蛋氨酸芥(phenamet); 吡柔比星(pirarubicin); 洛索蒽醌(losoxantrone); 2-乙基酰肼(ethylhydrazide); 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生(razoxane); 根霉素(rhizoxin); 西索菲兰(sizofiran); 螺旋锗(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺醌(triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类(trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素(verrucarin) A、杆孢菌素(roridin) A 和蛇行菌素(anguidin)); 乌拉坦(urethan); 长春地辛(vindesine) (ELDISINE®, FILDESIN®); 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥(mannomustine); 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇(mitolactol); 哌泊溴烷(pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara-C”); 塞替派(thiotepa); 类紫杉醇类(taxoids), 例如帕利他塞(paclitaxel) (TAXOL®)、清蛋白改造的纳米颗粒剂型紫杉醇(ABRAXANE™)和多西他塞(docetaxel) (TAXOTERE®); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 6-硫鸟嘌呤(thioguanine); 巯基嘌呤(mercaptopurine);

甲氨喋呤；铂类似物，诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin)；长春碱(vinblastine) (VELBAN®)；铂；依托泊苷(etoposide) (VP-16)；异环磷酰胺(ifosfamide)；米托蒽醌(mitoxantrone)；长春新碱(vincristine) (ONCOVIN®)；奥沙利铂(oxaliplatin)；亚叶酸(leucovorin)；长春瑞滨(vinorelbine) (NAVELBINE®)；能灭瘤(novantrone)；依达曲沙(edatrexate)；道诺霉素(daunomycin)；氨基蝶呤(aminopterin)；伊本膦酸盐(ibandronate)；拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；类视黄酸类(retinoids)，诸如视黄酸(retinoic acid)；任何上述物质的药剂学可接受盐、酸或衍生物；以及两种或多种上述物质的组合，诸如 CHOP（环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写）和 FOLFOX（奥沙利铂(ELOXATIN™)联合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写）。

该定义还包括抗激素剂，它们的作用为调节、减少、阻断或抑制可促进癌生长的激素的作用，并常常采取系统性，或者说全身性治疗的形式。它们自身可以为激素。例子包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂类(SERM)，包括例如他莫昔芬(tamoxifen)（包括 NOLVADEX®他莫昔芬）、雷洛昔芬(raloxifene) (Evista®)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene) (FARESTON®)；抗孕酮类；雌激素受体下调剂(ERD)；雌激素受体拮抗剂，诸如氟维司群(fulvestrant) (Faslodex®)；起抑制或关闭卵巢作用的药剂，例如促黄体生成激素释放激素(LHRH)激动剂，诸如醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate) (Lupron®及 Eligard®)、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林(buserelin acetate)和曲普瑞林(tripterelin)；抗雄激素类，诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡鲁胺(bicalutamide)；以及抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂，诸如例如 4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate) (MEGASE®)、依西美坦(exemestane) (AROMASIN®)、福美坦(formestane)、法偭唑(fadrozole)、伏罗唑(vorozole) (RIVISOR®)、来曲唑(letrozole) (FEMARA®)和阿那曲唑(anastrozole) (ARIMIDEX®)。另外，该化疗剂的定义包括二膦酸盐/酯，诸如氯膦酸盐/酯(clodronate)（例如 Bonefos®或 Ostac®）、依替膦酸盐/酯(etidronate) (Didrocal®)、NE-58095、唑来膦酸(zoledronic acid)/唑来膦酸盐/酯(zoledronate) (Zometa®)、阿伦膦酸

盐/酯(alendronate) (Fosamax®)、帕米膦酸盐/酯(pamidronate) (Aredia®)、替鲁膦酸盐/酯(tiludronate) (Skelid®)或利塞膦酸盐/酯(risedronate) (Actonel®); 以及曲沙他滨(troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是那些抑制牵涉粘着细胞增殖的信号途经中的基因表达的, 诸如例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体(EGF-R); 疫苗, 诸如 Theratope®疫苗和基因疗法疫苗, 例如 ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和 VAXID®疫苗; 拓扑异构酶 1 抑制剂(例如 Lurtotecan®); rmRH (例如 Abarelix®); lapatinib ditosylate (一种 ErbB-2 及 EGFR 双重酪氨酸激酶小分子抑制剂, 又称 GW572016); 及任何上述物质的药剂学可接受盐、酸或衍生物。

术语“细胞因子”是由一种细胞群释放, 作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子; 单核因子; 白介素(IL), 诸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15, 包括 Proleukin® rIL-2 和人 IL-4 和人 IL-4 突变体, 诸如例如在 IL-4 中涉及 IL-2R γ 结合的区域中含有突变的突变体, 例如 Arg21 变成 Glu 残基; 肿瘤坏死因子, 诸如 TNF- α 或 TNF- β ; 及其它多肽因子, 包括 LIF 和 kit 配体(KL)。在用于本文时, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物, 包括通过人工合成产生的小分子实体及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“激素”指多肽激素, 通常由具有导管的腺器官分泌。激素包括例如生长激素, 诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 胰岛素原; 松驰素; 雌二醇; 激素替代疗法; 雄激素, 诸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)或睾内酯(testolactone); 松驰素原; 糖蛋白激素类, 诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH); 促乳素; 胎盘催乳激素; 小鼠促性腺激素相关肽; 促性腺激素释放激素; 抑制素; 激活素; 穆勒氏(Mullerian)抑制性物质; 及血小板生成素。在用于本文时, 术语激素包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列激素的生物学活性等效物, 包括通过人工合成产生的小分子实体及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“生长因子”指促进生长的蛋白质, 包括例如肝生长因子; 成纤

维细胞生长因子；血管内皮生长因子；神经生长因子，诸如 NGF- β ；血小板衍生生长因子；转化生长因子(TGF)，诸如 TGF- α 和 TGF- β ；胰岛素样生长因子-I 和-II；促红细胞生成素(EPO)；骨诱导因子(osteoinductive factor)；干扰素，诸如干扰素- α 、- β 和- γ ；及集落刺激因子(CSF)，诸如巨噬细胞 CSF (M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞 CSF (GM-CSF)和粒细胞 CSF (G-CSF)。在用于本文时，术语生长因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列生长因子的生物学活性等效物，包括通过人工合成产生的小分子实体及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“整联蛋白”指容许细胞结合和应答胞外基质且牵涉多种细胞功能诸如伤口愈合、细胞分化、肿瘤细胞归巢和凋亡的受体蛋白质。它们是牵涉细胞-胞外基质和细胞-细胞相互作用的细胞粘附受体大家族的一部分。功能性整联蛋白由非共价结合的两个跨膜糖蛋白亚基组成，称为 α 和 β 。 α 亚基彼此都享有一定同源性， β 亚基也是如此。受体总是包含一条 α 链和一条 β 链。例子包括 $\alpha 6 \beta 1$ 、 $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 7 \beta 1$ 、LFA-1 等。在用于本文时，术语整联蛋白包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列整联蛋白的生物学活性等效物，包括通过人工合成产生的小分子实体及其药剂学可接受的衍生物和盐。

为了本发明的目的，“肿瘤坏死因子- α (TNF- α)”指包含 Pennica et al., Nature 312: 721 (1984)或 Aggarwal et al., JBC 260: 2345 (1985)中所记载的氨基酸序列的人 TNF- α 分子。“TNF- α 抑制剂”在本文中指在一定程度上抑制 TNF- α 的生物学功能的药剂，通常是通过结合 TNF- α 并中和其活性。本文具体设想的 TNF 抑制剂的例子有依那西普(etanercept) (Enbrel®)、infliximab (Remicade®)和 adalimumab (Humira™)。

“缓解疾病的抗风湿药物”或“DMARD”的例子包括羟氯喹、柳氮磺吡啶、甲氨喋呤、来氟米特、依那西普、infliximab（加上口服或皮下的甲氨喋呤）、硫唑嘌呤、D-青霉胺、金盐（口服）、金盐（肌肉内）、米诺环素(minocycline)、环孢霉素(cyclosporine)包括环孢霉素 A 和局部环孢霉素、葡萄球菌蛋白 A (Goodyear and Silverman, *J. Exp. Med.*, 197(9):1125-39 (2003))，包括其盐和衍生物等。

“非类固醇抗炎药物”或“NSAID”的例子包括阿司匹林、乙酰水杨酸、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、吲哚美辛(indomethacin)、舒林

酸(sulindac)、托美丁(tolmetin)、COX-2 抑制剂诸如塞来昔布(celecoxib) (Celebrex®; 4-(5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基)苯磺酰胺)和伐地考昔(valdecoxib) (Bextra®)、和美洛昔康(meloxicam) (MOBIC®), 包括其盐和衍生物等。优选的是, 它们是阿司匹林、萘普生、布洛芬、吲哚美辛或托美丁。

本文中“整联蛋白拮抗剂或抗体”的例子包括 LFA-1 抗体, 诸如可从 Genentech 购买的 efalizumab (Raptiva®); 或 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体, 诸如可从 Biogen Idec 购买的 natalizumab (Tysabri®); 或二氮杂环苯丙氨酸衍生物(WO 2003/89410)、苯丙氨酸衍生物(WO 2003/70709、WO 2002/28830、WO 2002/16329 和 WO 2003/53926)、苯基丙酸衍生物(WO 2003/10135)、烯胺衍生物(WO 2001/79173)、丙酸衍生物(WO 2000/37444)、链烷酸衍生物(WO 2000/32575)、取代苯基衍生物(美国专利 6,677,339 和 6,348,463)、芳香胺衍生物(美国专利 6,369,229)、ADAM 解联蛋白结构域多肽(US 2002/0042368)、 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白的抗体(EP 633945)、氮桥二环氨基酸衍生物(WO 2002/02556)等。

“皮质类固醇”(Corticosteroid)指如下所述的数种合成或天然存在的物质中的任一种: 它们具有类固醇的一般化学结构, 并模拟或增强天然存在皮质类固醇的效果。合成的皮质类固醇的例子包括泼尼松、泼尼松龙(包括甲泼尼龙, 诸如 Solu-Medrol®甲泼尼龙琥珀酸钠)、地塞米松或地塞米松曲安西龙、氢化可的松(hydrocortisone)及倍他米松(betamethasone)。本文中优选的皮质类固醇是泼尼松、甲泼尼龙、氢化可的松或地塞米松。

术语“BAFF”或“BAFF 多肽”、“TALL-1”或“TALL-1 多肽”、及“BlyS”在用于本文时涵盖“天然序列 BAFF 多肽”和“BAFF 变体”。

“BAFF”用来指称具有下面所示任一氨基酸序列的那些多肽, 及其具有天然 BAFF 生物学活性的同源物和片段及变体:

人 BAFF 序列(SEQ ID NO:16):

```

1
MDDSTEREQSRLTSCCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLALLSCC
61
LTVVSFYQVAALQGD LASLRAELQGHAEKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKI FEPPAP
121
GEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EE
181
KENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGH LIQRKKVHVFGDELSLVTLFR CIQNMPETL
241
PNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL

```

小鼠 BAFF 序列(SEQ ID NO:17):

```

1
MDESAKTLPPPCLCFCSEKGEDMKVGYDPITPQKEEGAWFGICRDGRLLAATLLLALLSS
61
SFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSATPAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSR
121
GHRNRRAFQGPETE QDVDLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNIIQDCLQLIADSDTP
181
TIRKGTYTTFVPWLLSFKRGNALEEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTDPIFAMGHVIQRKK
241
VHVFGDELSLVTLFR CIQNMPKTL PNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIPRENAQISRNGDD
301
TFFGALKLL

```

BAFF 的生物学活性可选自促进 B 细胞存活、促进 B 细胞成熟及与 BR3 结合。BAFF 变体优选将与 BAFF 多肽的天然序列具有至少 80%或上至 100%的任意连续整数，更优选包括至少 90%，甚至更优选至少 95%氨基酸序列同一性。

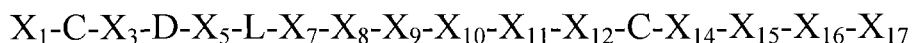
“天然序列”BAFF 多肽包括与衍生自自然界的相应 BAFF 多肽具有相同氨基酸序列的多肽。例如，BAFF 在用弗林(furin)型蛋白酶从细胞表面切下后以可溶形式存在。此类天然序列 BAFF 多肽可以从自然界分离，或者可以通过重组和/或合成手段生成。

术语“天然序列 BAFF 多肽”或“天然 BAFF”明确涵盖该多肽的天然存在的截短或分泌形式（例如胞外结构域序列）、天然存在的变体形式（例如可变剪接形式）、及天然存在的等位变体。术语“BAFF”包括下列文献中记载的那些多肽：Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); GenBank 编号 AF136293; WO 1998/18921, 公布于 1998 年 5 月 7 日；EP 869,180, 公布于 1998 年 10 月 7 日；WO 1998/27114, 公布于 1998 年 6 月 25 日；WO 1999/12964, 公布于 1999 年 3 月 18 日；WO 1999/33980, 公布于 1999 年 7 月 8 日；Moore *et al.*, *Science*, 285:260-263 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981

(1999)。

术语“BAFF拮抗剂”在用于本文时使用其最广泛的含义，包括任何如下所述的分子：(1)结合天然序列 BAFF 多肽或结合天然序列 BR3 从而部分或完全阻断 BR3 与 BAFF 多肽的相互作用，及(2)部分或完全阻断、抑制或中和天然序列 BAFF 的活性。在一个优选的实施方案中，要阻断的 BAFF 受体是 BR3 受体。天然 BAFF 活性促进 B 细胞存活和/或 B 细胞成熟等。在一个实施方案中，BAFF 活性的抑制、阻断或中和导致 B 细胞数目减少。依照本发明的 BAFF 拮抗剂将在体外和/或在体内部分或完全阻断、抑制或中和 BAFF 多肽的一种或多种生物学活性。在一个实施方案中，生物学活性 BAFF 在体外和/或在体内加强下列任一事件或事件组合：B 细胞存活增加、IgG 和/或 IgM 水平增加、浆细胞数目增加、及脾 B 细胞中 NF- κ B2/100 加工成 p52 NF- κ B (例如 Batten *et al.*, *J. Exp. Med.* 192:1453-1465 (2000); Moore *et al.*, *Science* 285:260-263 (1999); Kayagaki *et al.*, *Immunity* 17:515-524 (2002))。

如上所述，BAFF 拮抗剂在体外或在体内可以直接或间接的方式发挥作用来部分或完全阻断、抑制或中和 BAFF 信号传导。例如，BAFF 拮抗剂可直接结合 BAFF。例如，设想了这样的 BAFF 抗体：它们结合人 BAFF 中包含残基 162-275 和/或选自人 BAFF 的 162、163、206、211、231、233、264 和 265 的残基的邻近残基的区域使得抗体在空间上阻碍 BAFF 与 BR3 结合，其中所述残基编号依照 SEQ ID NO:16。在另一个例子中，直接结合物是这样的多肽，它包含 BAFF 受体中任何结合 BAFF 的部分，诸如 BAFF 受体的胞外结构域，或其结合天然 BAFF 的片段和变体。在另一个例子中，BAFF 拮抗剂包括这样的多肽，它们具有包含下面式 I 所示序列的多肽的序列：



(式 I) (SEQ ID NO:18)

其中 X1、X3、X5、X7、X8、X9、X10、X11、X12、X14、X15 和 X17 是

除了半胱氨酸之外的任何氨基酸；及

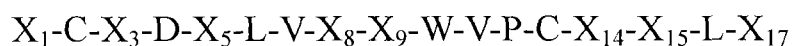
其中 X16 是选自 L、F、I 和 V 的氨基酸；且

其中所述多肽在式 I 最靠 N 端的半胱氨酸 C 的 N 端一侧 7 个氨基酸残基之内及最靠 C 端的半胱氨酸 C 的 C 端一侧 7 个氨基酸残基之内不含半胱氨酸。

在一个实施方案中，包含式 I 序列的多肽具有通过二硫键相连的两个 C；

$X_5LX_7X_8$ 形成 I 型 β 转角结构的构象, 其中转角的中心位于 L 和 X_7 之间; 且 X_8 的二面角 ϕ (phi) 具有正值。在一个实施方案中, X_{10} 选自 W、F、V、L、I、Y、M 和非极性氨基酸。在另一实施方案中, X_{10} 是 W。在另一实施方案中, X_3 是选自 M、V、L、I、Y、F、W 和非极性氨基酸的氨基酸。在另一实施方案中, X_5 选自 V、L、P、S、I、A 和 R。在另一实施方案中, X_7 选自 V、T、I 和 L。在另一实施方案中, X_8 选自 R、K、G、N、H 和 D-氨基酸。在另一实施方案中, X_9 选自 H、K、A、R 和 Q。在另一实施方案中, X_{11} 是 I 或 V。在另一实施方案中, X_{12} 选自 P、A、D、E 和 S。在另一实施方案中, X_{16} 是 L。在一个特定实施方案中, 式 I 序列是选自 ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO:19)、ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO:20)、ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO:21)、ECFDLLVRSWVPCMLR (SEQ ID NO:22)、ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO:23) 和 QCFDRLNAWVPCSVLK (SEQ ID NO:24) 的序列。在一个优选实施方案中, BAFF 拮抗剂包含选自 SEQ ID NO: 19、20、21、22 和 23 的任一氨基酸序列。

在另一个例子中, BAFF 拮抗剂包括这样的多肽, 它们具有包含式 II 序列的多肽的序列:



(式 II) (SEQ ID NO:25)

其中 X_1 、 X_3 、 X_5 、 X_8 、 X_9 、 X_{14} 、 X_{15} 和 X_{17} 是除了半胱氨酸之外的任何氨基酸, 且

其中所述多肽在式 II 最靠 N 端的半胱氨酸 C 的 N 端一侧 7 个氨基酸残基之内及最靠 C 端的半胱氨酸 C 的 C 端一侧 7 个氨基酸残基之内不含半胱氨酸。

在一个实施方案中, 包含式 II 序列的多肽具有通过两个 C 之间的二硫键; 具有 $X_5LX_7X_8$ 形成 I 型 β 转角结构的构象, 其中转角的中心位于 L 和 X_7 之间; 且 X_8 的二面角 ϕ 具有正值。在式 II 的另一实施方案中, X_3 是选自 M、A、V、L、I、Y、F、W 及非极性氨基酸的氨基酸。在式 II 的另一实施方案中, X_5 选自 V、L、P、S、I、A 和 R。在式 II 的另一实施方案中, X_8 选自 R、K、G、N、H 及 D-氨基酸。在式 II 的另一实施方案中, X_9 选自 H、K、A、R 和 Q。

在又一个实施方案中,由其衍生胞外结构域或其 BAFF 结合片段或 BAFF 结合变体的 BAFF 受体是 TACI、BR3 或 BCMA。或者,BAFF 拮抗剂可以与天然序列 BR3 的胞外结构域在其 BAFF 结合区处结合,从而在体外、原位或在体内部分或完全阻断、抑制或中和 BAFF 对 BR3 的结合。例如,这样的间接拮抗剂是如下所述的抗 BR3 抗体:它结合 BR3 中包含如下文定义的人 BR3 (SEQ ID NO:26)的残基 23-38 的区域或这些残基的邻近区域,从而在空间上阻碍人 BR3 与 BAFF 的结合。

在有些实施方案中,依照本发明的 BAFF 拮抗剂包括包含 BAFF 受体胞外结构域或其结合天然 BAFF 的片段和变体的 BAFF 抗体和免疫粘附素。在又一个实施方案中,由其衍生胞外结构域或其 BAFF 结合片段或 BAFF 结合变体的 BAFF 受体是 TACI、BR3 或 BCMA。在另一实施方案中,所述免疫粘附素包含如上所述的式 I 或式 II 的氨基酸序列,包括选自 SEQ ID NO: 19、20、21、22、23 和 24 的任一氨基酸序列。

根据一个实施方案,BAFF 拮抗剂以 100 nM 或 100 nM 以下的结合亲和力结合 BAFF 多肽或 BR3 多肽。根据另一实施方案,BAFF 拮抗剂以 10 nM 或 10 nM 以下的结合亲和力结合 BAFF 多肽或 BR3 多肽。根据另一实施方案,BAFF 拮抗剂以 1 nM 或 1 nM 以下的结合亲和力结合 BAFF 多肽或 BR3 多肽。

术语“BR3”、“BR3 多肽”或“BR3 受体”在用于本文时涵盖“天然序列 BR3 多肽”和“BR3 变体”(本文对其有进一步定义)。“BR3”用于指称包含下面所示氨基酸序列的那些多肽及其同源物,及其结合天然 BAFF 的变体或片段:

```
1
MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPPQ
61
ESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGD
121
KDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVTTKTAG
181
PEQQ
```

本发明的 BR3 多肽可以从多种来源分离,例如来自人组织类型或来自另一来源,或通过重组和/或合成方法制备。术语 BR3 包括 WO 2002/24909 和 WO 2003/14294 中记载的 BR3 多肽。

“天然序列”BR3 多肽或“天然 BR3”包括与衍生自自然界的相应 BR3

多肽具有相同氨基酸序列的多肽。此类天然序列 BR3 多肽可从自然界分离或通过重组和/或合成手段制备。术语“天然序列 BR3 多肽”明确涵盖该多肽的天然存在的截短、可溶或分泌形式（例如胞外结构域序列）、天然存在的变体形式（例如可变剪接形式）、及天然存在的等位变体。本发明的 BR3 多肽包括这样的 BR3 多肽：其包含人 BR3 (SEQ ID NO:26)的氨基酸残基 1 到 184 的连续序列或者由其组成。

BR3 “胞外结构域”或“ECD”指 BR3 多肽基本上不含跨膜结构域和胞质结构域的形式。ECD 形式的 BR3 包括这样的多肽，其包含选自人 BR3 的氨基酸 1-77、2-62、2-71、1-61、7-71、23-38 和 2-63 的任一氨基酸序列。本发明设想了这样的 BAFF 拮抗剂：它们是包含任一上述 ECD 形式的人 BR3 及其结合天然 BAFF 的变体和片段的多肽。

微型(Mini) BR3 指 BR3 的 BAFF 结合域中 26 个残基的核心区域，即氨基酸序列：TPCVPAECFD LLVRHCVACG LLRTPR (SEQ ID NO:27)。

“BR3 变体”意指这样的 BR3 多肽，其与天然序列全长 BR3 或 BR3 ECD 具有至少约 80%的氨基酸序列同一性并结合天然序列 BAFF 多肽。任选的是，BR3 变体包含单个富含半胱氨酸结构域。此类 BR3 变体多肽包括例如这样的 BR3 多肽，其中在全长氨基酸序列的 N 端和/或 C 端处及一个或多个内部结构域中添加或删除了一个或多个氨基酸残基。还设想了 BR3 ECD 的结合天然序列 BAFF 多肽的片段。根据一个实施方案，BR3 变体多肽将与人 BR3 多肽或其特定片段（例如 ECD）具有至少约 80%的氨基酸序列同一性，至少约 81%的氨基酸序列同一性，至少约 82%的氨基酸序列同一性，至少约 83%的氨基酸序列同一性，至少约 84%的氨基酸序列同一性，至少约 85%的氨基酸序列同一性，至少约 86%的氨基酸序列同一性，至少约 87%的氨基酸序列同一性，至少约 88%的氨基酸序列同一性，至少约 89%的氨基酸序列同一性，至少约 90%的氨基酸序列同一性，至少约 91%的氨基酸序列同一性，至少约 92%的氨基酸序列同一性，至少约 93%的氨基酸序列同一性，至少约 94%的氨基酸序列同一性，至少约 95%的氨基酸序列同一性，至少约 96%的氨基酸序列同一性，至少约 97%的氨基酸序列同一性，至少约 98%的氨基酸序列同一性或至少约 99%的氨基酸序列同一性。BR3 变体多肽不涵盖天然 BR3 多肽序列。根据另一实施方案，BR3 变体多肽的长度为至少约 10 个氨基酸，长度为至少约 20 个氨基酸，长度为至少约 30

个氨基酸，长度为至少约 40 个氨基酸，长度为至少约 50 个氨基酸，长度为至少约 60 个氨基酸或长度为至少约 70 个氨基酸。

在一个优选实施方案中，本文中的 BAFF 拮抗剂是包含结合 BAFF 的 BR3、TACI 或 BCMA 的一部分或其结合 BAFF 的变体的免疫粘附素。在其它实施方案中，BAFF 拮抗剂是 BAFF 抗体。“BAFF 抗体”是结合 BAFF 的抗体，优选在人 BAFF 中包含本文在“BAFF”定义下公开的人 BAFF 序列(SEQ ID NO:16)的残基 162-275 的区域内结合 BAFF。在另一实施方案中，BAFF 拮抗剂是 BR3 抗体。“BR3 抗体”是结合 BR3 的抗体，优选在人 BR3 中包含本文在“BR3”定义下公开的人 BR3 序列(SEQ ID NO:26)的残基 23-38 的区域内结合 BR3 的抗体。一般而言，本文所述人 BAFF 和人 BR3 的氨基酸位置是依照本文在“BAFF”和“BR3”定义下所公开的人 BAFF 和人 BR3（即分别为 SEQ ID NO:16 和 26）的序列编号。

BAFF 结合多肽或 BAFF 抗体的其它例子可见于例如 WO 2002/092620; WO 2003/014294; Gordon *et al.*, *Biochemistry* 42(20):5977-5983 (2003); Kelley *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(16):16727-16735 (2004); WO 1998/18921; WO 2001/12812; WO 2000/68378; WO 2000/40716。

“脂质体”指由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的，可用于对哺乳动物投递药物（诸如本文中公开的拮抗剂）的小囊泡。脂质体的成分通常排列成双层形式，与生物膜的脂质排列相似。

在用于本文时，术语“骨病症”指以骨丢失为特征的疾病，骨丢失即具有骨量或骨密度减少的症状或病理的疾病、疾患、病症或综合征。以骨丢失为特征的疾病的例子包括但不限于骨质溶解包括骨转移(osseous metastasis)、无菌性假体松动(aseptic prosthetic loosening)、牙周炎、骨质疏松、佩吉特病(Paget's disease)、转移性骨病(metastatic bone disease)和类风湿性关节炎。此类骨病症包括与自身免疫病诸如狼疮和类风湿性关节炎有关的那些。已经发现，患有 SLE 的女性的骨矿物质密度 T 得分显著低于没有提高的 SLE 疾病损伤的女性，与现行的皮质类固醇使用情况无关。此类骨病症还包括与低骨量有关的疾患，包括其中骨量水平低于世界卫生组织《Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843》的标准中定义

的年龄特异性正常值的疾患。与低骨量有关的疾患包括原发性和继发性骨质疏松。还包括牙周病、牙槽骨丢失、截骨术后和儿童期特发性骨丢失、以及骨质疏松的长期并发症诸如脊柱弯曲、身高下降和假体手术。此类病症可能影响低骨量者，诸如已知发生上述疾病包括骨质疏松的机会显著高于平均的脊椎动物例如哺乳动物（例如 50 岁以上的男性、绝经后女性）。所述病症可以用增加或提高骨量的方法来治疗，包括骨恢复(bone restoration)、提高骨折愈合速率、完全替换骨移植物手术、提高骨移植物成功率、面部重建或上颌重建或下颌重建后的骨愈合、假体内向生长(ingrowth)、椎骨连结或长骨延伸。本领域技术人员将认识到，术语“骨量”(bone mass)实际上指每单位面积的骨量，它有时（尽管严格来说不正确）称为骨矿物质密度(bone mineral density)。

本文中骨病症的例子包括骨质疏松，诸如原发性或继发性骨质疏松，并包括糖皮质激素诱导的骨质疏松，局灶性骨侵蚀或诸如类风湿性关节炎所致的疾病，并包括边缘性关节侵蚀(marginal joint erosion)和软骨下骨侵蚀(subchondral bone erosion)（骨髓）、佩吉特病(Paget's disease)、骨缺损、异常增加的骨周转、牙周病、牙丢失、假体周围骨质溶解、成骨不全(osteogenesis imperfecta)、转移性骨病、恶性高钙血症、儿童期特发性骨丢失(childhood idiopathic bone loss)、牙槽骨丢失(alveolar bone loss)、骨折、骨质减少诸如近关节骨质减少(juxta-articular osteopenia)、多发性骨髓瘤和相关疾患诸如瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)和/或单克隆丙种球蛋白病(monoclonal gammopathy)中的骨疾病。本文中优选的骨病症是多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症和单克隆丙种球蛋白病中的骨疾病及骨质疏松，更优选继发性骨质疏松，仍更优选炎症过程中的骨丢失。不伴随恶性的骨病症也在本发明的范围内。

“继发性骨质疏松”包括脊椎动物，例如哺乳动物（包括人类）中炎症过程中的骨丢失、糖皮质激素诱导的骨质疏松、甲状腺功能亢进诱导的骨质疏松、固定诱导的骨质疏松(immobilization-induced osteoporosis)、肝素诱导的骨质疏松和免疫抑制诱导的骨质疏松。在用于本文时，术语“骨吸收”指至少部分由破骨细胞活性引起的不想要的骨丢失。

“骨质溶解”指灾难性的骨丢失，或包括类风湿性关节炎、骨转移、无菌性假体松动和牙周炎的一系列疾病状态的虚弱性病理后果。类风湿性

关节炎(RA)是一种慢性炎性疾病,常常导致长期残疾和升高的死亡率。

“骨原细胞”(Osteoprogenitor)指衍生自骨基质细胞的已分化骨前体细胞。

“牙原细胞”(Odontoprogenitor)指衍生自牙周韧带的已分化骨前体细胞。

在用于本文时,术语“抑制”指减少或降低特定活性的数量、质量或效果,可以与术语“降低”、“最小化”和“减少”互换使用,例如指对哺乳动物施用治疗有效量的本发明化合物所致的破骨细胞骨侵蚀活性的降低。治疗如本文所定义的骨病症包括抑制骨吸收、破骨细胞发生或破骨细胞功能及治疗以骨丢失为特征的疾病。

在用于本文时,术语“有效量”意指抗体或拮抗剂有效治疗骨病症的量。因此,在一个方面,组合物在用来治疗与骨丢失有关的疾患或者其中促进骨生长有益的疾患方面的“有效量”是足以抑制骨丢失和/或增加骨形成,或足以抑制破骨细胞活性的量。在一个更具体的或可供选择的方面,在给易患或患有以骨丢失为特征的疾病的个体施用治疗有效量的化合物后,有效量的化合物产生表现为个体中骨丢失速率降低的医学效果。有效量通常通过将它们所起的效果与在对相似情况的个体施用不含有效成分的组合物(即对照)时所见的效果相比较而确定。另外,组合物的“有效量”是产生统计学上显著的效果的量,诸如骨折修复速率、骨质疏松中骨丢失的逆转、关节损伤的愈合速率的增加、软骨缺损逆转的增加、骨长入假体装置的增加或加速、及牙缺损修复的改善等等的统计学上显著的增加。

术语“包装插页”用于指通常包括在商业包装的治疗用产品中的说明书,它们包含有关涉及此类治疗用产品应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症、与该包装产品联用的其它治疗用产品和/或警告等等的信息。

“药物”指治疗骨病症或其症状或副作用的活性药物。

II. 疗法

在一个方面,本发明提供了治疗哺乳动物中的骨病症的方法,包括对哺乳动物施用结合B细胞表面标志的拮抗剂,优选抗体,更优选CD20抗体。

确切的剂量将由临床医师按照公认的标准来确定,考虑要治疗的疾患

的性质和严重性、拮抗剂的类型、哺乳动物/患者特征等。确定剂量在本领域普通技术水平之内。取决于施用的途径和方法，蛋白质可单剂施用、作为延时输注(prolonged infusion)施用、或在延长时段中间歇施用。静脉内施用将通过推注或输注施用，后者经历的典型时间为一到数个小时。可使用持续释放配制剂。一般而言，CD20 拮抗剂的治疗有效量是足以在所治疗的疾患中产生临床上显著的变化量的量，诸如临床上骨折修复所需时间的显著减少、空隙(void)或其它缺损体积的显著减小、骨密度的显著增加、发病率的显著降低、或组织学得分的显著增加。

在一个优选实施方案中，剂量为约 400 mg 到 1.3 g，频率为约 1 个月的期间内约 1 到 4 剂，更优选约 500 mg 到 1.2 g，仍更优选约 750 mg 到 1.1 g。在另一个优选实施方案中，抗体以约 2 到 4 剂施用，更优选以约 2 到 3 剂，最优选以约 2 剂施用。在一个更优选的实施方案中，抗体在约 2 到 3 周、更优选约 2 周的期间内施用。

所用的具体剂数（一个、两个、三个或更多）取决于例如所治疗的骨病症的类型；所用抗体的类型；是否使用、使用何种类型及使用多少及使用多少如下所述的第二药物；及施用的方法和频率。若施用多于 1 剂，则在后的剂量（例如第二剂或第三剂）优选在自前一剂施用起约 1 到 20 日、更优选约 6 到 16 日，最优选约 14 到 16 日时施用。优选在约 1 日到 4 周，更优选约 1 到 20 日的总期间内（例如 6-18 日的总期间内）施用多剂。在这样一个方面，以大约每周一次施用多剂，其中第二剂在距自第一剂起约 1 周时施用，且任何第三剂或随后的剂量在自第二剂起约 1 周时施用。所述多剂抗体的每剂优选为约 0.5 到 1.5 g，更优选约 0.75 到 1.3 g。

对于局部施用，诸如用于在骨折或其它骨缺损中再生骨，可以在约 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 伤口面积的范围范围内施用蛋白质。

然而，如上面提到的，拮抗剂的这些建议量在治疗中有很大的可裁量性。在合适剂量的选择和进度安排中的关键因素是得到的效果，如上面指出的。例如，开始可能需要相对较高剂量来治疗发作中的和急性的疾病。后续剂量可高于在先剂量。为获得最有效的效果，取决于疾病或病症，拮抗剂的施用尽可能接近疾病或病症的第一征候、诊断、出现或发生，或者在疾病或病症缓解过程中施用。

拮抗剂以任何合适的手段施用，包括胃肠外、皮下、腹膜内、吸入、

鞘内、关节内及鼻内，以及，如果需要局部免疫抑制治疗的话，病变内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。另外，拮抗剂可合适的通过脉冲输注(pulse infusion)施用，例如施用递减剂量的拮抗剂。优选通过注射，最优选静脉内或皮下注射进行剂量给药，这部分取决于施用是短暂的还是长期的。

本领域技术人员在决定有效量时将考虑诸如哺乳动物的年龄、活动水平、激素平衡、一般健康状况等因素，使有效量与该哺乳动物相适应，例如通过开始使用低剂量，并滴定该剂量以决定有效量。通过本文所述的研究发现，增加 β 葡聚糖的浓度并不一定增加对破骨细胞活性的抑制，可能实际上减少对破骨细胞活性的抑制。在 100 pg 的效果与用二膦酸盐/酯所得的效果相似，多种形式的二膦酸盐/酯用作控制骨质疏松的药物。

哺乳动物可以用所述拮抗剂/抗体再次治疗，如通过给予多于 1 次暴露或 1 组剂量的拮抗剂/抗体，诸如暴露于拮抗剂/抗体至少约 2 次，例如约 2 到 60 次暴露，更具体的说为约 2 到 40 次暴露，最具体的说为约 2 到 20 次暴露。可以以不同间隔施用此类暴露，诸如例如约 24-28 周或 48-56 周或更长。优选的是，以每次约 24-26 周或约 38-42 周或约 50-54 周的间隔施用此类暴露。在一个实施方案中，每次拮抗剂/抗体暴露是作为单剂该拮抗剂/抗体提供的。在一个供选择的实施方案中，每次拮抗剂/抗体暴露是作为多剂抗体提供的。然而，并非每次拮抗剂/抗体暴露均需要作为单剂或作为多剂提供。

优选的拮抗剂是抗体，例如未偶联细胞毒剂的抗体诸如 RITUXAN®。在本文列出的方法中，B 细胞表面标志或 CD20 抗体可以是裸抗体，或者可以偶联另一分子，诸如共价连接至骨靶向剂。本文中优选的 CD20 抗体是嵌合的、人源化的或人的 CD20 抗体，更优选 rituximab、人源化 2H7（例如包含 SEQ ID NO:2 和 8 中的可变域序列，或包含在 SEQ ID NO:8 中具有改变 N100A 或 D56A/N100A 的重链可变域及在 SEQ ID NO:2 中具有改变 M32L、或 S92A、或 M32L/S92A 的轻链可变域，或包含 SEQ ID NO:30 所示轻链可变区(V_L)序列及 SEQ ID NO:8 所示重链可变区(V_H)序列，其中所述抗体还在 V_H -CDR2 中含有氨基酸取代 D56A 且 V_H -CDR3 中的 N100 取代为 Y 或 W，尤其是包含 SEQ ID NO:31 所示 v511 轻链序列及 SEQ ID NO:32 所示 v511 重链序列)、嵌合或人源化 A20 抗体(Immunomedics)或 HUMAX-CD20™ 人

CD20 抗体(Genmab)。仍更优选的是 rituximab 或人源化 2H7。在另一方面,优选的抗体诱导如上文定义的主要临床响应。

在本文中所有方法的进一步的实施方案中,哺乳动物先前没有用诸如治疗破骨细胞相关病症的药剂或免疫抑制剂的药物治疗过骨病症,而且/或者先前从未用针对 B 细胞表面标志的拮抗剂或抗体治疗过(例如先前从未用 CD20 抗体治疗过)。在进一步的实施方案中,哺乳动物在以任意上述方法治疗之前,包括在初次或此后的抗体剂量组之后,可能已有骨病症复发,或者患有其它组织损伤诸如肾损伤。然而,优选的是,哺乳动物在至少初次治疗之前没有发生过这样的复发。

在人和非人动物中需要刺激骨生成的任何情形均可使用结合 B 细胞表面标志的拮抗剂。兽医用途包括用于家养动物(domestic animals),包括家畜(livestock)和宠物动物(companion animals)。具体的应用包括但不限于骨折,包括骨不连合骨折(non-union fracture)和愈合不良(comprised healing)患者诸如糖尿病患者、酗酒者和老年人中的骨折;骨移植物;放射诱导的骨坏死后的愈合骨;植入物(implants),包括关节置换物(joint replacements)和牙植入物;手术所致的骨缺损的修复,诸如切除肿瘤后的颅-上颌面部修复、外伤后的手术重建、遗传性或其它躯体异常的修复、和整形手术中骨愈合的促进;牙周病的治疗和其它牙缺损的修复;骨癌症治疗性处理后的骨缺损的治疗;在牵拉骨生成技术(distraction osteogenesis)过程中骨形成的增加;关节损伤的治疗,包括软骨和韧带的修复;罹患骨关节炎的关节的修复;腱的修复和再附着(re-attachment);骨质疏松的治疗(包括年龄相关骨质疏松、绝经后骨质疏松、糖皮质激素诱导的骨质疏松和废用性骨质疏松(disuse osteoporosis))及其它以骨丢失增加和骨形成减少为特征的疾患;绝经前女性中骨量峰值的上升;和在与硬膜有关的结缔组织的愈合中的用途。

在本文的任何方法中,可以将结合 B 细胞表面标志的拮抗剂或抗体与有效量的第二药物(其中结合 B 细胞表面标志的拮抗剂或抗体(例如 CD20 抗体)是第一药物)一起施用给哺乳动物。本发明的方法还可以结合使用矫形装置,诸如脊椎融合笼(spinal fusion cage)、脊椎融合器具(spinal fusion hardware)、内用和外用骨固定装置、螺钉(screws)和栓(pins)。第二药物可以是一种或多种药物,包括例如治疗破骨细胞相关病症的药剂、细胞毒剂、免疫抑制剂、抗痛剂、或其任何组合。也可以应用本领域技术人员知道的

其它各种疗法。此类第二药物的类型取决于多种因素，包括骨病症的类型、骨病症的严重程度、哺乳动物的状况和年龄、所使用的第一药物的类型和剂量、等等。

此类别的药物的例子包括治疗破骨细胞相关病症的药剂、化疗剂、干扰素类药物诸如干扰素 α （例如来自 Amarillo Biosciences, Inc.）、IFN- β -1a (REBIF[®] 和 AVONEX[®]) 或 IFN- β -1b (BETASERON[®])、寡肽诸如醋酸格拉默 (glatiramer acetate) (Copaxone[®])、阻断 CD40-CD40 配体的药剂、细胞毒剂或免疫抑制剂（诸如米托蒽醌(NOVANTRONE[®])、甲氧喋呤、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、来氟米特和硫唑嘌呤）、静脉内免疫球蛋白(γ 球蛋白)、淋巴细胞消减疗法（例如米托蒽醌、环磷酰胺、CAMPATH[™] 抗体、抗 CD4、克拉屈滨 (cladribine)、一种具有至少两个包含抗原或其片段的结构域的多肽构建体，其中所述抗原或其片段是脱免疫(de-immunized)、自身反应性的，并受到自身反应性 B 细胞的 Ig 受体的特异性识别(WO 2003/68822)、全身照射、骨髓移植、整联蛋白拮抗剂或抗体（例如 LFA-1 抗体，诸如可购自 Genentech 的 efalizumab/RAPTIVA[®]，或 α 4 整联蛋白抗体，诸如可购自 Biogen Idec 的 natalizumab/TYSABRI[®]，或上述的其它）、类固醇诸如糖皮质类固醇（例如甲泼尼龙诸如注射用 SOLU-MEDROL[®] 甲泼尼龙琥珀酸钠、泼尼松诸如低剂量泼尼松、地塞米松或糖皮质激素，例如通过关节注射，包括系统性皮质类固醇疗法）、非淋巴细胞消减性免疫抑制疗法（例如 MMF 或环孢霉素）、“他汀”类降胆固醇药（包括西立伐他汀(cerivastatin) (Baycol[™])、氟伐他汀 (fluvastatin) (Lescol[™])、阿托伐他汀(atorvastatin) (Lipitor[™])、洛伐他汀 (lovastatin) (Mevacor[™])、普伐他汀(pravastatin) (Pravachol[™])和辛伐他汀 (simvastatin) (Zocor[™])）、雌二醇、睾酮（任选以提高的剂量；Stuve et al. *Neurology* 8:290-301 (2002)）、雄激素、激素替代疗法、TNF 抑制剂诸如针对 TNF- α 的抗体、DMARD、NSAID、血浆去除术或血浆交换、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(trimethoprim-sulfamethoxazole) (BACTRIM[™], SEPTRA[™])、霉酚酸吗乙酯(mycophenolate mofetil)、H2 阻断剂或质子泵抑制剂（在使用潜在致溃疡性免疫抑制疗法期间）、左甲状腺素(levothyroxine)、环孢霉素 A（例如 Sandimmune[®]）、somatastatin 类似物、细胞因子、抗代谢物、免疫抑制剂、康复性手术、放射性碘(radioiodine)、甲状腺切除术、BAFF 拮抗剂诸如 BAFF 或 BR3 抗体或免疫粘附素、抗 CD40 受体或抗 CD40 配体(CD154)、抗 IL-6

受体拮抗剂/抗体、另一 B 细胞表面拮抗剂或抗体诸如人源化 2H7 或其它人源化或人 CD20 抗体及 rituximab, 等等。

优选的此类药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂、化疗剂、细胞毒剂、抗整联蛋白、 γ 球蛋白、抗 CD4、克拉屈滨、甲氧苄氨嘧啶磺胺甲基异噁唑、H2 阻断剂、质子泵抑制剂、皮质类固醇、环孢霉素、他汀类降胆固醇药、雌二醇、睾酮, 雄激素, 激素替代药、TNF 抑制剂、DMARD、NSAID (用来治疗例如肌肉骨骼症状)、左甲状腺素、环孢霉素 A、somatastatin 类似物、BAFF 拮抗剂诸如 BAFF 抗体或 BR3 抗体尤其是 BAFF 抗体、免疫抑制剂、和另一 B 细胞表面标志抗体, 诸如 rituximab 与人源化 2H7 或其它人源化 CD 抗体的组合。

更优选的此类药物是治疗破骨细胞相关病症的药剂, 诸如细胞因子、免疫抑制剂, 包括针对 TNF- α 的抗体、针对 CD40-CD40 配体的抗体、和 BAFF 拮抗剂诸如 BAFF 或 BR3 抗体、DMARD、细胞毒剂、整联蛋白拮抗剂、NSAID、或激素, 或其组合。例如, 涉及主要器官的非常活跃的疾病可能需要免疫抑制剂, 包括诸如环磷酰胺(CYTOXAN[®])、苯丁酸氮芥、来氟米特、MMF、硫唑嘌呤(IMURAN[®])和甲氨喋呤等药剂。为了功效, BAFF 拮抗剂可以与第一药物组合使用。

更优选的是治疗破骨细胞相关病症的药剂例如细胞因子诸如 IL-4、免疫抑制剂、或其组合, 最优选的是治疗破骨细胞相关病症的药剂和/或免疫抑制剂, 进一步最优选二膦酸盐/酯和/或甲氨喋呤。

在一个特别优选的实施方案中, 第二药物是或含一种或多种治疗破骨细胞相关病症的药剂。

在一个进一步特别优选的实施方案中, 第二药物是免疫抑制剂, 更优选环磷酰胺、MMF、苯丁酸氮芥、硫唑嘌呤、来氟米特或甲氨喋呤, 优选至少与初始的数剂抗体一起使用。在一个实施方案中, 优选使用硫唑嘌呤、甲氨喋呤或 MMF 代替环磷酰胺来维持缓解。

在进一步优选的方面, 第二药物是一种或多种治疗破骨细胞相关病症的药剂和免疫抑制剂的组合。

所有这些第二药物可以相互组合或单独与第一药物一起使用, 因而表述“第二药物”在用于本文时并不意味着其是除了第一药物之外唯一的药物。因此, 第二药物不必是一种药物, 而可能构成或包含多于一种这样的

药物。

本文列出的这些第二药物一般使用相同的剂量，施用途径如上文中所用的，或者使用此前所用剂量的 1 到 99%。如果确实要使用这样的第二药物，优选的是，它们以低于不使用第一药物时的量使用，尤其是在用第一药物初次剂量给药之后的给药中使用，以消除或减少由此所致的副作用。组合施用包括共施用，使用分开的配制剂或单一药用配制剂，及以任一顺序连续施用，其中优选有一段时间所有活性剂同时发挥它们的生物学活性。

对于本文中的复治方法，在与成剂量组的抗体一起施用有效量的第二药物时，它可以与任何剂量组一起施用，例如只与一个剂量组一起施用，或者与多于一个剂量组一起施用。在一个实施方案中，第二药物与初始剂量组一起施用。在另一实施方案中，第二药物与初始剂量组和第二剂量组一起施用。在又一个实施方案中，第二药物与所有剂量组一起施用。

第二药物的组合施用包括共施用（同时施用），使用分开的配制剂或单一药用配制剂，及以任一顺序连续施用，其中优选有一段时间所有活性剂（药物）同时发挥它们的生物学活性。

本文中的抗体或拮抗剂以任何合适的手段施用，包括胃肠外、局部、皮下、腹膜内、肺内、鼻内和/或病变内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内(i.v.)、动脉内、腹膜内或皮下施用。还设想了鞘内施用（见例如 US 2002/0009444, Grillo-López, A., 有关 CD20 抗体的鞘内投递）。另外，抗体或拮抗剂可合适的通过脉冲输注施用，例如施用递减剂量的抗体或拮抗剂。优选通过静脉内或皮下，更优选通过静脉内输注给予剂量给药。

如果提供多个剂量组的抗体，每个剂量组可通过相同或不同的施用手段提供。在一个实施方案中，每个剂量组通过静脉内施用。在另一实施方案中，每个剂量组通过皮下施用给予。在又一个实施方案中，剂量组通过静脉内和皮下二者施用，且抗体可以相同或不同。

下面讨论生产、修饰和配制此类拮抗剂和抗体的方法。

III. 拮抗剂和抗体的生成

本发明的方法和制品使用或包含结合 B 细胞表面标志的拮抗剂。因此，这里将描述产生此类拮抗剂的方法。

要用于生成或筛选拮抗剂的 B 细胞表面标志可以是例如含有所需表位

的可溶性形式的抗原或其部分。或者/并且,可以使用在它们的细胞表面表达 B 细胞表面标志的细胞来产生或筛选拮抗剂。可用于产生拮抗剂的其它形式的 B 细胞表面标志对于本领域技术人员将是显而易见的。优选的是, B 细胞表面标志是 CD19 或 CD20 抗原。

尽管优选的拮抗剂是抗体,然而本文还设想了抗体之外的拮抗剂。例如,拮抗剂可包括小分子拮抗剂,任选与细胞毒剂(诸如本文所述的那些)融合或偶联。可以针对本文中的目的 B 细胞表面标志对小分子文库进行筛选,以鉴定结合该抗原的小分子。可以进一步筛查所述小分子的拮抗特性,和/或将其与细胞毒剂偶联。

拮抗剂还可以是通过合理设计(rational design)或噬菌体展示产生的肽(见例如 1998 年 8 月 13 日公布的 WO98/35036)。在一个实施方案中,所选的分子可以是基于抗体 CDR 设计的“CDR 模拟物”(CDR mimic)或抗体类似物。尽管此类肽自身可以是拮抗性的,然而这些肽可任选与细胞毒剂偶联以添加或增强该肽的拮抗特性。

下面描述了用于生产根据本发明使用的抗体拮抗剂的例示性技术。

(i) 多克隆抗体

多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来生成。使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中 R 和 R^1 是不同的烃基,将相关抗原与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的,例如匙孔蛾血蓝蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

通过将例如 100 μg 或 5 μg 蛋白质或偶联物(分别用于兔或小鼠)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混和并将该溶液皮内注射于多个部位,将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。一个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏完全佐剂中初始量 1/5-1/10 的肽或偶联物对动物进行加强免疫。7-14 天后,采集动物的血液,并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫,直到滴度达到稳定(plateau)。优选的是,将动物用相同抗原但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行加强免疫。偶联物还

可在重组细胞培养中作为蛋白质融合物来制备。同样，适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

(ii) 单克隆抗体

单克隆抗体是从一群基本上同质的抗体获得的，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。因此，修饰语“单克隆”表示所述抗体并非不同抗体的混合物的特征。

例如，单克隆抗体可使用最初由 Kohler et al., Nature 256: 495 (1975)描述的杂交瘤方法来制备，或者可通过重组 DNA 方法（美国专利第 4,816,567 号）来制备。

在杂交瘤方法中，如上所述免疫小鼠或其它适宜的宿主动物，诸如仓鼠，以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞，所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者，可以在体外免疫淋巴细胞。然后，使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，以形成杂交瘤细胞（Goding, 《Monoclonal Antibodies: Principles and Practice》，第 59-103 页，Academic Press, 1986）。

将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养，所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如，若亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT)，则用于杂交瘤的培养基典型的将含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷（HAT 培养基），这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的。在这些细胞中，优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系，诸如那些可从索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA)获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤及可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA)获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞衍生的。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于生成人单克隆抗体也已有记载（Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur 等人, 《Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications》，第 51-63 页，Marcel Dekker, Inc., New York, 1987）。

可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是，通过免疫沉淀或通过体外结合测定法，诸如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)，测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson et al., Anal. Biochem. 107: 220 (1980)的 Scatchard 分析来测定。

在鉴定得到生成具有期望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后，所述克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆，并通过标准方法进行培养（Goding, 《Monoclonal Antibodies: Principles and Practice》，第 59-103 页，Academic Press, 1986）。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外，杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

可通过常规免疫球蛋白纯化流程，诸如例如蛋白 A-Sepharose[®]、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析，将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

单克隆抗体还可以重组产生。编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常规流程分离和测序（例如通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针）。以杂交瘤细胞作为此类 DNA 的优选来源。一旦分离，可将 DNA 置于表达载体中，然后将该表达载体转染到原本不生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中，诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞，以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述性论文包括 Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol. 5: 256-262 (1993)及 Plückthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992)。

在另一个实施方案中，可从使用 McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990)所述技术构建的噬菌体抗体库中分离抗体或抗体片段。Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991)及 Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续出版物记载了通过链改组（Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)），以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略（Waterhouse et al., Nuc. Acids Res. 21: 2265-2266 (1993)），生成高亲和力（nM 范围）的人抗体。如此，这些

技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

还可以修饰 DNA，例如通过替代即用人重链和轻链恒定域的编码序列代替同源鼠序列（美国专利第 4,816,567 号; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 (1984)），或通过将非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价接合。

典型的，用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定域，或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变域，以产生嵌合二价抗体，它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

(iii) 人源化抗体

本领域已经记载了用于将非人抗体人源化的方法。优选的是，人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基，它们典型的取自“输入”可变域。人源化可基本上遵循 Winter 及其同事的方法进行（Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988)），通过用高变区序列替代人抗体的相应序列。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体（美国专利第 4,816,567 号），其中本质上少于整个人可变域用来自非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体典型的是其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

用于构建人源化抗体的人可变域的选择，包括轻链和重链二者，对于降低抗原性非常重要。依照所谓的“最适” (best-fit) 方法，用啮齿类抗体的可变域序列对已知的人可变域序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架区 (FR)（Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987)）。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993)）。

更为重要的是，抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的

生物学特性。为了实现这一目标，依照一种优选的方法，通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是公众可获得的，且为本领域技术人员所熟悉。可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像容许分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用，即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样，可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合，从而获得期望抗体特征，诸如对靶抗原的亲和力提高。一般而言，高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

(iv) 人抗体

作为人源化的替代方法，可生成人抗体。例如，现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成完整全集的转基因动物（例如小鼠）。例如，已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击后生成抗体。参见例如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno. 7: 33 (1993); 及美国专利第 5,591,669 号、第 5,589,369 号和第 5,545,807 号。

或者，噬菌体展示技术（McCafferty et al., Nature 348: 552-553 (1990)）可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变域(V)基因全集生成抗体和抗体片段。依照这种技术，将抗体 V 结构域基因以符合读码框的方式克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因中，并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，以抗体的功能特性为基础进行的选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。如此，噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行；有关综述参见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991)从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库中分离得到大量

不同的抗噁唑酮抗体。可本质上遵循 Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)或 Griffith et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993)所述技术, 由未免疫人供体构建 V 基因全集和分离针对大量不同抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利第 5,565,332 号和第 5,573,905 号。

还可通过体外活化的 B 细胞来生成抗体(参见美国专利第 5,567,610 号和第 5,229,275 号)。

(v) 抗体片段

已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上, 通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985))。然而, 现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如, 可从上文讨论的噬菌体抗体库中分离抗体片段。或者, 可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段(Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992))。依照另一种方法, 可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员将是显而易见的。在其它实施方案中, 选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 WO 93/16185; 美国专利第 5,571,894 号; 和美国专利第 5,587,458 号。抗体片段还可以是“线性抗体”, 例如如美国专利第 5,641,870 号中所述。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

(vi) 双特异性抗体

双特异性抗体指具有对至少两种不同表位的结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可结合 B 细胞表面标志的两种不同表位。其它此类抗体可结合第一 B 细胞标志, 并结合第二 B 细胞表面标志。或者, 可将抗 B 细胞标志结合臂与结合白细胞上触发分子诸如 T 细胞受体分子(例如 CD2 或 CD3)或 IgG 的 Fc 受体(FcγR), 诸如 FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和 FcγRIII (CD16)的臂组合在一起, 使得细胞防御机制聚焦于所述 B 细胞。双特异性抗体还可用于将细胞毒剂定位于所述 B 细胞。这些抗体拥有 B 细胞标志结合臂和结合细胞毒剂(例如肥皂草毒蛋白、抗干扰素-α、长春花生物碱类、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨喋呤或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性

抗体制备成全长抗体或抗体片段（例如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体）。

用于构建双特异性抗体的方法是本领域知道的。全长双特异性抗体的传统生成基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达，其中两种链具有不同的特异性（Millstein et al., *Nature* 305: 537-539 (1983)）。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤（四源杂交瘤(quadroma)）生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产量低。WO 93/08829 及 Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991)中公开了类似的流程。

依照一种不同的方法，将具有期望结合特异性（抗体-抗原结合位点）的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。融合优选使用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定域。优选的是，在至少一种融合物中，第一重链恒定区(CH1)包含轻链结合所必需的位点。将编码免疫球蛋白重链融合物和，如果需要，免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体，并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中，这为调整三种多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。然而，在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时，有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个表达载体。

在该方法的一个优选实施方案中，双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链，和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对（提供第二结合特异性）构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径，因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法公开于 WO 94/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如 Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986)。

依照美国专利第 5,731,168 号中记载的另一种方法，可改造一对抗体分子之间的界面，以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分抗体恒定区 C_H3 结构域。在该方法中，将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链（例如酪氨酸或色氨酸）替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）替

换，在第二抗体分子的界面上产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如，异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联，另一种抗体与生物素偶联。例如，此类抗体建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞（美国专利第 4,676,980 号），及用于治疗 HIV 感染（WO 91/00360、WO 92/200373 和 EP 03089）。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的，并且连同许多交联技术一起公开于美国专利第 4,676,980 号。

文献中还记载了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如，可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al., Science 229: 81 (1985)记载了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 $F(ab')_2$ 片段的流程。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原，以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将 Fab'-TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab'-硫醇，并与等摩尔量的另一种 Fab'-TNB 衍生物混合，以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

最新的进展便于从大肠杆菌中直接回收 Fab'-SH 片段，这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)记载了生成完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。每个 Fab' 片段由大肠杆菌分开分泌，并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达 ErbB2 受体的细胞和正常人 T 细胞，以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳癌靶物的溶胞活性。

还记载了从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如，已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny et al., J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原而形成单体，然后重新氧化而形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)描述的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)，所述接头太短使得同一

条链上的两个结构域之间不能配对。因此，迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对，由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)。

设想了具有超过两个效价的抗体。例如，可制备三特异性抗体。Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)。

IV. 拮抗剂的偶联物和其它修饰

本文的方法中使用的或本文的制品中包含的拮抗剂任选偶联另一药剂，诸如骨靶向剂，从而通过将 CD20 拮抗剂和靶向性分子偶联，可以增强例如系统施用的本发明组合物的投递。“靶向性分子”是结合目标组织的分子。例如，骨靶向性分子包括四环素类、钙荧光素(calcein)、二磷酸盐/酯类、聚天冬氨酸、聚谷氨酸、氨基磷酸糖类(aminophosphosugars)、已知与骨的矿质相(mineral phase)有关的肽（例如骨粘连蛋白、骨涎蛋白和骨桥蛋白）、骨特异性抗体、具有骨盐(bone mineral)或骨细胞结合域的蛋白质（例如降钙素）等等。参见例如 EP 512,844、EP 341,961 和 Brinkley, Bioconjugate Chem. 3:2-13 (1992)的公开。

偶联通常通过共价连接来实现；共价连接的确切性质将由靶向性分子和 CD20 拮抗剂多肽上的连接位点来决定。通常，非肽药剂通过添加接头来修饰，通过该接头的氨基酸侧链、糖链或由化学修饰导入到 CD20 拮抗剂上的反应性基团容许与 CD20 拮抗剂偶联。例如，可以通过下列手段附着药物：通过赖氨酸残基的 ϵ -氨基；通过游离的 α -氨基；通过与半胱氨酸残基的二硫键交换；或通过用高碘酸氧化碳水化合物链中的 1,2-二醇，使含有不同亲核试剂的药物可通过席夫(Schiff)碱连接而附着。参见例如美国专利 4,256,833。

蛋白质修饰剂包括胺反应性试剂（例如反应性酯，异氰酸盐/酯、醛和磺酰卤）、硫醇反应性试剂（例如卤代乙酰衍生物和马来酰亚胺）、及羧酸反应性和醛反应性试剂。CD20 拮抗剂多肽可以通过使用双功能交联试剂与肽试剂共价连接。异双功能试剂更为常用，可允许两种不同蛋白质通过两种不同反应性模块（例如胺反应性加硫醇、碘乙酰胺或马来酰亚胺）受控偶联。此类连接剂的使用在本领域是公知的。参见例如 Brinkley, 同上和

美国专利 4,671,958。也可以使用肽接头。作为选择, 可通过制备融合多肽来将 CD20 拮抗剂多肽与肽模块连接。

其它双功能蛋白质偶联剂的例子包括: N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。

或者, 包含拮抗剂和药剂的融合蛋白可以通过例如重组技术或肽合成来制备。

本文设想了拮抗剂的其它修饰。例如, 可以将拮抗剂与多种非蛋白质性质聚合物中的一种相连, 例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物。

本文所公开的拮抗剂可以配制为脂质体。含有拮抗剂的脂质体通过本领域已知的方法制备, 例如 Epstein *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 及 1997 年 10 月 23 日公布的 WO97/38731。美国专利 5,013,556 公开了循环时间增强的脂质体。

特别有用的脂质体可以用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物通过反相蒸发方法产生。将脂质体挤压通过限定孔径的滤器产生具有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可以通过二硫键交换反应与 Martin *et al. J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) 所述的脂质体偶联。脂质体中任选含有化疗剂。参见 Gabizon *et al. J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989)。

设想了本文所述蛋白质或肽拮抗剂的氨基酸序列修饰。例如, 可能希望改进拮抗剂的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过将适宜的核苷酸改变引入拮抗剂核酸或者通过肽合成来制备拮抗剂的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如拮抗剂氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。只要最终的构建物具有期望特性, 可进行删除、插入和替代的任意组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可改变拮抗剂的翻译后加工, 诸如改变糖基化

位点的数目或位置。

可用于鉴定拮抗剂中作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种方法称作“丙氨酸扫描诱变”，如 Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)所述。这里，鉴定了一个残基或一组靶残基（例如带电荷的残基，诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸），并用中性或带负电荷的氨基酸（最优选丙氨酸或聚丙氨酸）替代，以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体，推敲那些对替代展现出功能敏感性的氨基酸位置。如此，虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的，但是突变本身的性质不需要预先决定。例如，为了分析在给定位点处的突变的后果，在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变，并对所表达的拮抗剂变体筛选期望活性。

氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端的融合，长度范围从一个残基至包含上百个或更多残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N-末端甲硫氨酰残基的拮抗剂或与细胞毒性多肽融合的拮抗剂。拮抗剂分子的其它插入变体包括在拮抗剂的 N-或 C-末端融合酶或提高拮抗剂血清半衰期的多肽。

另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在拮抗剂分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替换。抗体拮抗剂中最感兴趣的替代诱变位点包括高变区，但也设想了 FR 改变。保守替代在表 1 中显示在标题“优选替代”下。如果此类替代导致生物学活性的改变，那么可以引入表 1 中称为“例示替代”的更实质性改变，或如下文中关于氨基酸种类的进一步描述，并筛选产物。

表 1

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp

Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

对拮抗剂生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来实现：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。根据共同的侧链特性，天然存在的残基分为下面各组：

- (1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性亲水的：Cys、Ser、Thr；
- (3) 酸性的：Asp、Glu；
- (4) 碱性的：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；及
- (6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员替换另一个类别的。

任何不牵涉保持拮抗剂正确构象的半胱氨酸残基也可替代，通常用丝氨酸，以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反，可向拮抗剂中添加半胱氨酸键以改善其稳定性（特别是当拮抗剂是抗体片段诸如 Fv 片段时）。

特别优选的一类替代变体牵涉替代亲本抗体的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法是使用噬菌体

展示的亲和力成熟。简单的说,将数个高变区位点(例如6-7个位点)突变,在每个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,作为与每个颗粒内包装的M13基因III产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构,以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生此类变体,如本文所述对该组变体进行筛选,可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

拮抗剂的另一类氨基酸变体改变了拮抗剂的原始糖基化样式。改变意味着删除在拮抗剂中发现的一个或多个碳水化合物模块,和/或添加拮抗剂中不存在的一个或多个糖基化位点。

多肽的糖基化典型的或是N-连接的或是O-连接的。N-连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此,多肽中这两种三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

向拮抗剂中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利的完成(用于N-连接的糖基化位点)。所述改变还可通过向原始拮抗剂的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于O-连接的糖基化位点)。

编码拮抗剂的氨基酸序列变体的核酸分子通过多种本领域已知的方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过对于早先制备的变体或非变体形式的拮抗剂进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

可能希望在效应器功能方面修饰本发明的拮抗剂,例如增强拮抗剂的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可通过在抗体拮抗剂Fc区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者/

另外,可在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而容许在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改进的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。参见 Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)和 Shopes, B., J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)中记载的异双功能交联剂来制备。或者,抗体可改造成具有双重Fc区,由此可具有增强的补体溶解和ADCC能力。参见 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)。

为了延长拮抗剂的血清半衰期,可如例如美国专利第5,739,277号中所述将补救受体结合表位掺入拮抗剂(尤其是抗体片段)。在用于本文时,术语“补救受体结合表位”指IgG分子(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)的Fc区中负责延长IgG分子体内血清半衰期的表位。

V. 药用配制剂

可通过将具有期望纯度的拮抗剂与任选的药剂学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol, A. 编,1980)混合,以冻干剂型或水溶液的形式,制备根据本发明使用的拮抗剂的治疗用配制剂供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

WO 1998/56418 中记载了示例性的抗CD20抗体配制剂。此出版物描述了一种液态多剂量配制剂,包含40 mg/mL rituximab, 25 mM 乙酸盐, 150 mM

海藻糖, 0.9%苯甲醇, 0.02%聚山梨醇酯 20, pH 5.0, 最小保存期限为 2-8℃ 条件下 2 年。另一种感兴趣的抗 CD20 配制剂包含 10 mg/mL rituximab 于 9.0 mg/mL 氯化钠, 7.35 mg/mL 二水合柠檬酸钠, 0.7 mg/mL 聚山梨醇酯 80, 及注射用无菌水, pH 6.5 中。

美国专利 6,267,958 (Andya *et al.*) 中记载了适应皮下施用的冻干配制剂。此类冻干配制剂可用合适的稀释剂重建至高蛋白质浓度且重建的配制剂可皮下施用于本文中待治疗的哺乳动物。

本文中的配制剂还可在必要时含有超过一种活性化合物(上面提到的第二药物), 优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。此类药物的类型和有效量取决于例如配制剂中拮抗剂存在的量和所治疗哺乳动物的临床参数。优选的此类药物如上所述。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羧甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》, 第 16 版, Osol, A. 编, 1980。

可制备持续释放配制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物半透性基质, 该基质是定型产品的形式, 例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利第 3,773,919 号)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

本文中其它药剂学可接受的投递媒介包括生物相容性固体或半固体基质, 包括骨粉(powdered bone)、陶瓷、生物可降解性和生物不可降解性合成聚合物, 以及天然聚合物; 组织粘合剂(例如基于纤维蛋白的); 水性聚合凝胶、水溶液、脂质体等等。下文公开了示例性的配制剂和投递媒介。此公开是例示性的; 本领域技术人员容易找出合适的备选物, 包括具体指明的物质的衍生物和物质组合。配制剂还可包括一种或多种别的生长因子、赋形剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂、用于防止小瓶表面上蛋白质损失的清蛋白, 等等。配制方法是本领域熟知的, 例如在 *Remington: The Science and*

Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19th ed., 1995 中有记载。

CD20 拮抗剂可以作为组织粘合剂的组分施用。基于纤维蛋白的组织粘合剂是本领域已知的，可以从血浆或重组来源制备。组织粘合剂包含纤维蛋白原和因子 XIII，临使用前加入凝血酶以活化交联。见例如美国专利 4,414,976; 4,427,650; 和 4,928,603。在必须修复结缔组织的疾患，诸如韧带或腱撕裂的治疗中，使用组织粘合剂可能是特别有利的。CD20 拮抗剂还可以与基于胶原的粘合剂组合。胶原可以从天然或重组来源分离。

对于填补不连合骨折、空洞(cavities)或其它骨缺损而言，固体和半固体基质是优选的投递媒介。这些基质提供了天然骨的空隙填补替代物，包括骨替代剂诸如磷酸三钙、羟基磷灰石、磷酸三钙与羟基磷灰石的组合、聚甲基丙烯酸甲酯、铝酸盐和其它陶瓷，和脱矿质冷冻干燥骨皮质。固体和半固体基质还可以从多种聚合材料制备。半固体基质提供了展性(maleability)的优势，从而可以将它们成型以提供精确的骨缺损填补。基质可包含其它活性或惰性组分。特别感兴趣的是促进组织生长或浸润的那些药剂。促进骨生长的药剂包括骨形态发生蛋白(美国专利 4,761,471 和 WO 90/11366)，成骨蛋白(Sampath *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7109-7113 (1987))和 NaF (Tencer *et al.*, *J. Biomed. Mat. Res.* 23: 571-589 (1989))。

生物可降解的合成聚合物包括聚酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚碳酸酯、聚富马酸酯、聚羟基丁酸酯、乙烯聚合物等等。具体的例子包括但不限于聚交酯、聚乙交酯、聚交酯/聚乙交酯共聚物、聚二噁烷酮、聚乙交酯/碳酸三亚甲基酯(trimethylene carbonate)共聚物、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。此类材料可以制成多种形状，包括薄膜(films)、板(plates)、栓(pins)、杆(rods)、螺钉(screws)、块(blocks)、栅格(lattices)等等，用于附着或插入骨。参见例如美国专利 5,863,297 和 WO 93/20859。这些材料还可包括载体(carrier)诸如清蛋白、聚氧乙烯山梨聚糖去污剂或谷氨酸。原则上，任何提高聚合物降解、在基质中形成孔、或降低基质对生长因子的吸附的物质都可用作载体。可以用作载体的聚氧乙烯山梨聚糖去污剂包括聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯、聚氧乙烯山梨聚糖单月桂酸酯、聚氧乙烯山梨聚糖单棕榈酸酯、聚氧乙烯山梨聚糖单硬脂酸酯和聚氧乙烯山梨聚糖三油酸酯。还可以包含增塑剂。

一般而言，如本文所述的薄膜或装置施用于骨的损伤位点。施用一般是通过使用标准外科手术方法植入骨内或附着于表面。

生物可降解聚合物薄膜作为假体装置和外科手术植入物的涂层是特别有用的。可以将此类薄膜例如包裹在外科手术用螺钉、杆、栓、板等等的外表面周围，或者将它们自身卷成卷或者以其它方式形成各种形状。此类可植入装置常规用于整形外科手术。薄膜还可用于包被骨填充材料，诸如羟基磷灰石块、脱矿质骨基质栓(plugs)、胶原基质等等。在用于本文时，术语“共聚物”包括任何含有两种或两种以上单体单元的聚合物。

基质的降解及随之发生的生长因子从基质的释放可以通过调节诸如分子量、共聚物结构、共聚物比(copolymer ratio)、基质厚度、孔隙率等参数，以及通过加入上文公开的载体来调控。例如，PLA/PGA 薄膜通常配制为提供 75:25 到 25:75 之间的 PLA:PGA 比，更常用的是 65:35 到 35:65 之间。一般而言，将使用分子量为 10,000 到 200,000 道尔顿的共聚物来制备植入物。一般而言，分子量较低的共聚物将比分子量较高的配制剂降解得更快；随机共聚物的晶体性较低，因此比其它类型的共聚物降解更快；对映异构体丙交酯的聚合物是晶体性的，因此比它们对应的消旋体更抗降解。

聚合物基质根据本领域已知的方法制备。参见例如美国专利 4,902,515; Gilding and Reed, *Polymer* 20: 1459-1464 (1979); 和美国专利 3,773,919。例如，PLA/PGA 共聚物植入物通过如下过程生产：在合适的溶剂（例如氯仿或二氯甲烷）中混合所需量的 PLA/PGA 共聚物颗粒，将所得溶液倒入模具，然后完全蒸发溶剂。作为选择，PLA/PGA 植入物可通过压模成型、挤出或其它已知方法生产。为装填基质，将 CD20 拮抗剂和载体作为粉末或液态溶液施加。例如，可以将冻干的 CD20 拮抗剂和清蛋白均匀的分散在聚合物薄膜的一个面上，再将薄膜翻叠。通过重复该过程，可以构成聚合物和 CD20 拮抗剂的多层“三明治”。或者，蛋白质可以作为水溶液施加（例如在磷酸盐缓冲盐水或 0.1 M 乙酸中），并让它干燥。多孔的植入物可以浸泡在 CD20 拮抗剂的溶液中（任选含有其它组分），让液体蒸发。可以将 CD20 拮抗剂加工到展性聚合物基质中，然后将基质成型为合适的形状，在升高的温度（例如 60-65℃）下固化。多孔植入物可以通过在真空下固化基质来制备。

CD20 拮抗剂还可以与生物可降解海绵，例如明胶、胶原、纤维素或几

丁质海绵组合来投递。此类海绵是本领域已知的。参见例如美国专利 2,465,357; 美国专利 4,271,070 和 WO 90/13320。将 CD20 拮抗剂及任选的一种或多种其它治疗剂的溶液注射到海绵中, 将海绵在 30-100℃ 的温度晾干足够的时间, 使含水量降低到 50% 以下, 优选 10% 以下。

凝胶也可以用作投递媒介。例如, 美国专利 5,427,778、5,770,228、4,717,717 和 5,457,093 公开了使用水性聚合物凝胶投递生长因子。凝胶包括生物相容性、水溶性或水可溶胀性的, 在水中形成粘性溶液的聚合物, 此类聚合物包括但不限于多糖, 包括甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、右旋糖苷、淀粉、壳聚糖和海藻酸; 糖胺聚糖, 包括透明质酸、软骨素、硫酸软骨素、肝素和硫酸乙酰肝素; 蛋白质, 包括胶原、明胶和纤连蛋白; 及丙烯酰胺, 包括聚丙烯酰胺和聚甲基丙烯酰胺。凝胶通常制备为室温下具有 200 cps 到 100,000 cps 的粘度, 更通常为约 1000 cps 到 30,000 cps, 其中后一范围相当于水中约 0.25-10% 羟乙基纤维素。更高粘度的凝胶在本领域是已知的(例如美国专利 5,427,778)。粘度可以通过改变成分聚合物的浓度和/或长度来调节。凝胶是通过将聚合物与合适的缓冲液, 诸如中性或略酸性 pH 的低离子强度的柠檬酸盐、磷酸盐或乙酸盐缓冲液混合而制备的。通常将包含防腐剂(抗微生物剂)诸如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲醇等。彻底混合之后, 用合适的手段将溶液灭菌(例如高压灭菌)。将混合物冷却, 加入过滤除菌的 CD20 拮抗剂。

CD20 拮抗剂局部投递的备选手段包括渗透压微型泵(例如 ALZET[®] minipumps; Alza Corporation, Mountain View, Calif.); 带电荷的右旋糖苷珠子, 如 WO 92/03125 中公开的; 基于胶原的投递系统, 诸如 Ksander 等人(*Ann. Surg.* 211:288-294, 1990)公开的; 和基于海藻酸盐的系统, 诸如 Edelman 等人(*Biomaterials*, 12:619-626, 1991)公开的。本领域已知的其它骨中持续局部投递方法包括可以用治疗剂浸透的多孔涂层金属假体及掺入治疗组合物的固体塑料棒。

还可以通过对个体施用治疗有效量的 CD20 拮抗剂, 用 CD20 拮抗剂治疗骨质疏松。可以使用体内剂量给药测定法(dosing assay)在完整动物中检测 CD20 拮抗剂蛋白质。原型剂量给药(prototypical dosing)可以通过皮下、腹膜内或口服施用来实现, 并可以通过注射、持续释放或其它投递技术来进

行。施用 CD20 拮抗剂的时间可变化（例如 28 天和 35 天可能是合适的）。

CD20 拮抗剂可以植入哺乳动物体内,使 CD20 拮抗剂与成骨细胞接触,从而发生成骨细胞增殖并刺激骨生长。例如,可将 CD20 拮抗剂和骨形态发生蛋白(BMP)一起置于基质中。BMP 诱导间质成骨细胞前体迁移到位并进一步诱导间质细胞分化为成骨细胞。然后 CD20 拮抗剂将刺激成骨细胞进一步增殖。合适的基质由多孔材料的颗粒构成。孔的直径必须容许祖细胞迁移及随后的分化和增殖,一般在 70-850 μm 的范围,通常是 150-420 μm 。含有 CD20 拮抗剂的基质可以模成型为包围骨缺损的形状。基质材料的例子有微粒的(particulate)、脱矿质的(demineralized)、胍提取的(guanidine extracted)、物种特异性的骨。其它潜在有用的基质材料包括胶原、乙醇酸和乳酸的同聚物和共聚物、羟基磷灰石、磷酸三钙和其它磷酸钙盐。CD20 拮抗剂可以以足够的浓度施加到基质中以促进成骨细胞增殖,优选以至少 1 $\mu\text{g/mL}$ 基质的浓度。也可以将 CD20 拮抗剂的溶液直接注射到骨折位点以加速骨折愈合。BMP 和基质用于生产的应用的例子公开于 WO 92/07073, WO 91/05802, 美国专利 5,645,591 和美国专利 5,108,753。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这很容易通过无菌滤膜过滤来实现。

在另一个实施方案中,本发明提供了在体外刺激骨形成细胞或其前体生长和/或分化的方法。使用这些方法,可以从患者收获细胞,离体扩增,然后返回给患者,如上文一般描述的。特别感兴趣的是骨髓细胞的生长和/或分化,这些细胞可以在分化刺激剂存在下培养,发育为成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞及其它。原代培养物中经分化细胞的鉴定主要是表型性的。例如,成骨细胞的表型标志包括碱性磷酸酶的表达(Manduca *et al.*, *J. Bone Min. Res.* 8:281 (1993))、I 型胶原合成(Kurihara *et al.*, *Endocrinol.* 118(3):940-947 (1986))、骨钙蛋白的生成(Yoon *et al.*, *Biochem.* 27:8521-8526 (1988))、及对甲状旁腺素的响应性(Aubin *et al.*, *J. Cell Biol.*, 92:452-461 (1982))。成骨细胞通常在 37° C、5% CO₂ 条件下在生长培养基中培养,所述培养基包含碳源、氮源、必需氨基酸、维生素、矿物质和一般由胎牛血清供应的生长因子。本领域中已知多种合适的培养基。供这些细胞类型用的组织培养培养基中加入约 10 $\mu\text{g/ml}$ 到约 1000 ng/ml 浓度的 CD20 拮抗剂多肽。本领域技术人员将会认识到,CD20 拮抗剂蛋白质可有利的与其它生

长因子在培养基中混合。

骨缺损也可以使用基因疗法的手段来修复,其中对患者施用编码针对 B 细胞表面标志的抗体的多核苷酸。在这方面有用的基因投递系统包括腺病毒、腺伴随病毒和裸 DNA 载体。参见例如美国专利 5,399,346; Mann *et al.*, *Cell* 33:153 (1983); 美国专利 4,650,764; 美国专利 4,980,289; Markowitz *et al.*, *J. Virol.* 62:1120 (1988); 美国专利 5,124,263; WO 95/07358; 和 Kuo *et al.*, *Blood* 82:845 (1993)。特别感兴趣的是受影响组织的局部感染,诸如将载体局部应用于牙周袋、骨折、关节、植入物位点或假体附着位点。

在一种备选的基因疗法手段中,US 2004/0126364 披露了使用活牙原细胞或骨原细胞(OPC)向哺乳动物投递多肽以促进骨组织生长,该方法可用于本发明。所述细胞可以用于自体或同种异基因细胞移植,作为基于细胞的平台以位点特异性、受调控的方式投递本发明的抗体。设想了系统性基于细胞的投递,以及结合 B 细胞表面标志的抗体诸如 CD20 抗体在骨质溶解病变位点的基于细胞的投递。后者使抗体得以集中于有炎症效应细胞(例如巨噬细胞)及骨质溶解效应细胞(例如破骨细胞前体细胞)定位的发炎位点附近。所述细胞含有遗传工程化的病毒或非病毒质粒载体,该载体通常含有可调控、可诱导的成骨细胞特异性启动子,以指导抗体在骨中特定的植入物位点表达,来抑制骨质溶解。

用于这些方法的目的的细胞通常限于(committed to)成骨细胞谱系。例如,从自体或同种异基因牙周韧带分离骨基质细胞,离体操作后,植入受体患者。通过在细胞外基质(ECM)组分,诸如 MATRIGEL™ (Becton Dickenson)或其它商品化基质制备物存在下,优选在一种或多种骨形态发生蛋白(BMP)诸如 BMP-2、-4 或-6 存在下进行培养,诱导骨髓基质细胞或韧带衍生细胞的分化状态。向祖细胞分化的诱导在对细胞的基因操作之前或之后进行;然而,优选在用含有编码一种或多种治疗性抗体的基因的逆转录病毒表达载体转导分化细胞之前进行该步骤。

与未分化的基质细胞相比,已分化的祖细胞具有提高的建造骨组织的能力。OPC 或牙原细胞区别于骨基质细胞(以及脂肪、肌肉或软骨细胞或组织)之处在于碱性磷酸酶的产生、骨钙蛋白的表达及骨涎蛋白的表达(在牙原细胞的情况下,还有牙本质涎蛋白的表达)。

从来自骨髓抽吸物的基质细胞分离并扩增 OPC,并在 ECM 存在下离体

分化。扩增自体骨髓基质细胞。在分化和转导细胞之前，任选将这些细胞冷冻并长时间保存在液氮中。这些“库存的”(banked)自体细胞容许在长时间内多次接种，这是有益的，因为类风湿性关节炎可能持续多年。

由于预期使用此类细胞会带来临床效益，在进一步的方面，本发明设想了抑制哺乳动物中的骨质溶解的方法，包括向所述哺乳动物中导入分离的牙原细胞或骨原细胞，所述细胞包含编码结合 B 细胞表面标志的抗体，优选 CD20 抗体的核酸。哺乳动物是例如患有或有风险发生牙周炎或可能导致骨丢失例如牙槽骨丢失的其它骨病症的人类患者。本文中描述的方法还可用于兽医用途，例如治疗犬、猫、马。

OPC 经过遗传修饰而含有编码本发明抗体的核酸，其可操作连接于启动子，该启动子指导与其相连的核酸的转录，优先在已分化为成骨细胞的细胞中。通常构建逆转录病毒表达载体。此类构建物中优选的启动子是成骨细胞特异性启动子，诸如上文指出的美国专利申请中记载的那些具有骨钙蛋白、骨涎蛋白或牙本质骨涎蛋白启动子序列的启动子，和/或启动反式激活蛋白四环素激活蛋白(tetracycline activator)(rtTA)基因转录的启动子，该基因继而调控治疗性抗体的产生。另外，可以使用此类启动子的截短片段，其优先在牙原细胞或 OPC（与其它细胞类型相比）中起指导转录的功能。优选的是，可修饰 OPC 而增加 α -5 整联蛋白受体的表达。该修饰使得细胞在植入体内时粘附于骨基质蛋白，这带来了又一个优点，即 OPC 可以无需预先包裹，例如包裹在多孔磷酸钙陶瓷管或其它类型的包裹装置中，而直接插入骨质溶解位点。编码抗体的核酸的表达优选是可诱导的。成骨细胞或成牙本质细胞转录调控 DNA 可以用来在转录单位中控制抗体的表达。调控序列，例如顺式作用细胞特异性转录控制元件，在转录单位中可以位于抗体编码核酸序列的 5' 一侧。

抗体编码序列的表达可以通过使细胞接触抗生素化合物，诸如例如四环素或四环素类似物（例如米诺环素或多西环素(doxycycline)）来调控，在一个具体的实施方案中，将四环素和米诺环素均给予哺乳动物，或者一起给予，或者分别给予。此类抗生素化合物优选系统施用。

例如，四环素在牙周手术前至少两天，例如，和植入本发明的细胞时系统施用，和/或在手术和/或植入后至少两天系统施用。当抗生素存在于组织中时，即当它施用于细胞植入物受体时，细胞的抗体表达开启。抗生素

的施用停止后，抗体的表达减少并停止。典型的，抗生素在手术前 8-12 天和手术后 8-12 天施用。类似的，抗生素在整形手术，例如从连接关节去除软骨或去除转移性骨肿瘤的手术（此时将细胞植入患病组织或其邻近位点）之前和之后施用。

如果细胞是牙原细胞，所述哺乳动物可以患有或有风险发生牙周炎，或牙周病所致的牙槽骨丢失。细胞可以在植入牙整形假体之前、之中或之后植入。为治疗晚期牙周病，细胞可以局部施用于颌的下颌部分中的牙周韧带。

为治疗骨病症，可以将骨原细胞植入受体哺乳动物的骨髓或哺乳动物的连接关节中。例如，将所述细胞施用到胫骨内或股骨内。将细胞局部植入例如骨丢失位点或此类位点邻近处，例如骨髓中。

将细胞移植到哺乳动物骨髓中方法的是本领域公知的，例如美国专利 4,188,486 所述。施用的细胞剂量范围为 1×10^6 个细胞到 1×10^{10} 个细胞，其体积适于移植的定位（例如相比于植入股骨骨髓，植入下颌组织或牙周韧带使用较小的体积）。此类植入方法的临床规程是本领域已知的。例如，可对股骨骨髓施用 1×10^8 个细胞每 kg 体重的剂量。对于长期疾病诸如类风湿性关节炎，反复植入可能是必需的。

任选与所述抗体一起施用治疗破骨细胞相关病症的药剂，诸如例如 IL4，特别是重组人 IL-4，或 TNF- α 抑制剂。另外，可任选施用其它第二药物，诸如 NSAID 和抗痛剂，包括阿司匹林、布洛芬和吲哚美辛，以及双芳基 COX-2 抑制性化合物（例如美国专利 5,994,379 所述）和(甲基磺酰基)-苯基-2-(5H)-呋喃酮（例如美国专利 6,020,343 所述）。更优选还施用 IL-4 或 TNF- α 抑制剂。

将分离的遗传修饰的 OPC 用于治疗患有或有风险发生骨丢失病症的个体，诸如类风湿性关节炎、骨质疏松、根尖周或软骨内骨丢失、人工关节颗粒诱导的骨质溶解、骨折或缺乏、原发性或继发性甲状旁腺功能亢进、转移性骨病、骨质溶解性骨病、整形手术后的(post-plastic surgery)、假体关节手术后的(post-prosthetic joint surgery)。更优选的是，此类哺乳动物可患有或有风险发生类风湿性关节炎或根尖周或软骨内骨丢失、人工关节颗粒诱导的骨质溶解、或骨质溶解性骨转移。如此，例如，经工程化而分泌本发明抗体的 OPC 可以植入由于发生植入物诱导的骨质溶解而正经历人工关节

置换校正的患者，以及患有类风湿性关节炎所致的骨丢失的患者，以及由于严重牙周病而植入口腔。

VI. 制品

在本发明的另一实施方案中，提供了含有可用于治疗上文所述的骨病症的材料的制品。在一个方面，所述制品包括：(a)容器，其中装有结合 B 细胞表面标志的拮抗剂（例如如此结合的抗体，包括 CD20 抗体）（优选的是，该容器在该容器内装有拮抗剂或抗体及药剂学可接受的载体或稀释剂）；和(b)包装插页，其印有治疗哺乳动物诸如患者中的骨病症的说明书，其中所述说明书表明所述拮抗剂或抗体以有效量施用，诸如例如在约一个月的期间内对患者施用约 400 mg 到 1.3 g 每剂拮抗剂或抗体，频率为 1 到 4 剂。

在一个优选的实施方案中，本发明的制品还包括装有第二药物的容器，其中拮抗剂或抗体是第一药物。该制品还在包装插页上包含用有效量的第二药物治疗患者的说明书。第二药物可以是任何上面列出的那些药物，例如示性的第二药物有治疗破骨细胞相关病症的药剂、免疫抑制剂、细胞毒剂、整联蛋白拮抗剂或激素。优选的第二药物是如上所述优选的那些，最优选的是治疗破骨细胞相关病症的药剂或免疫抑制剂或上述二者。

在另一个方面，本发明提供了一种制品，其包括：(a)容器，其中装有结合 B 细胞表面标志的抗体（例如 CD20 抗体）（优选的是，该容器在该容器内装有所述抗体及药剂学可接受的载体或稀释剂）；和(b)包装插页，其印有治疗哺乳动物中的骨病症的说明书，其中所述说明书表明对哺乳动物施用所述抗体，施用的量有效提供抗体初始剂量组和后随的抗体第二剂量组，其中直到距初始剂量组约 16 到 54 周时才提供第二次暴露。

优选的是，此类包装插页印有治疗哺乳动物中的骨病症的说明书，其中所述说明书表明对哺乳动物施用抗体，施用的量有效提供约 0.5 到 4 g 的抗体初始暴露及随后约 0.5 到 4 g 的抗体第二暴露，其中直到距初始暴露约 16 到 54 周时才提供第二接触，且每次抗体暴露作为约 1 到 4 剂提供给哺乳动物，优选作为单剂或者作为 2 到 4 剂的抗体。

在这个发明方面的一个优选实施方案中，本发明的制品还包括装有第二药物的容器，其中抗体是第一药物，且该制品还在包装插页上包含用有

效量的第二药物治疗哺乳动物的说明书。第二药物可以是任何上面列出的那些药物，例示性的第二药物有治疗破骨细胞相关病症的药剂、免疫抑制剂、细胞毒剂、整联蛋白拮抗剂或激素，最优选的是治疗破骨细胞相关病症的药剂或免疫抑制剂或上述二者。

在所有上述方面，包装插页在容器上或伴随容器。合适的容器包括例如瓶(bottles)、小瓶(vials)、注射器(syringes)等等。容器可以用多种材料诸如玻璃或塑料制成。容器容纳或含有有效治疗骨病症的组合物，并可以具有无菌出入口（例如该容器可以是具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶）。组合物中的至少一种活性剂是所述拮抗剂或抗体。标签或包装插页表明该组合物用于治疗适于治疗的哺乳动物，诸如患者，例如患有或倾向患上骨疾病诸如本文列出的那些骨疾病的受试者，及关于所提供拮抗剂或抗体以及任何其它药物的给药量和间隔的具体指示。制品可以进一步包括其它容器，该容器装有药剂学可接受的稀释缓冲剂，诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和/或右旋糖溶液。制品还可包括其它从商业和使用者观点看有需要的材料，包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

下面的非限制性实施例说明了本发明进一步的细节。在此明确的将本说明书中所有引用的公开内容引入本文作为参考。

实施例 1: 血清生化标志与对类风湿性关节炎的 rituximab 治疗的响应有关背景:

已经发现用 rituximab (RTX; Rituxan® /MabThera®)靶向 B 细胞提供了治疗类风湿性关节炎(RA)的新途径。在甲氨喋呤处置下仍有活动性类风湿性关节炎的患者中进行的一项随机化有对照试验显示：单个疗程的两次 rituximab 输注，单独施用或联合环磷酰胺或继续使用甲氨喋呤，在第 24 周 (Edwards et al., N. Engl. J. Med. (2004), 同上; Pavelka et al., 同上)和第 48 周 (Edwards et al., N. Eng. J. Med. (2004), 同上)均提供了疾病活动的显著改善，这种改善在有些患者中持续了两年(Emery et al., (2004), 同上)。然而，关于它治疗 RA 的作用机制或它对于 RA 患者中各种生物学标志的影响还知之甚少。具体而言，还不知道 B 细胞消减疗法，诸如 rituximab，对破骨细胞的活性是否会有影响。

目的:

为了进一步了解 rituximab 对血清生物标志的影响及该影响是否与临床所见一致, 考察了炎症和骨周转的多种血清学标志。

方法:

分析了来自 RA+患者的血清样品, 所述患者接受了单独的甲氨喋呤 (MTX), 或者 MTX 与单个疗程 rituximab 的联合用药, 作为将另行报道的一项 RA 中 rituximab IIa 期研究的一部分。测量了基线第 24 周的下列标志: 抗 CCP、CRP、S100、SAA、P1NP 和骨钙蛋白(OC)。

结果:

主要终点即 24 周时的 ACR50 应答显示, 接受相隔两周的两次 rituximab 输注并继续进行 MTX 给药的患者, 与仅接受 MTX 的患者相比, 实现了显著更高的临床响应。使用非参数(non-parametric)手段, 通过比较 MTX 组与 RTX+MTA 组中在 24 周时相对于基线的百分比变化来分析生物标志数据。使用下面的公式对相对于基线的中值百分比变化作图:

$$Pcfbl \text{ (标志)} = ((\text{slope_lr} * \text{最后一次访问的研究时间}) / \text{intercept_lr}) * 100$$

其中 slope_lr = 每名患者线性回归的斜率
intercept_lr = 每名患者线性回归的截距

24 周时 RTX+MTX 组中观察到的临床响应也伴随着所分析标志的血清水平的显著变化。结果如表 2 所示。

表 2
24 周时相对于基线的中值%变化

	MTX (n=40)	Rituximab+MTX (n=40)	P 值*
抗 CCP ¹	-21.03	-45.78	0.0012
CRP ²	-22.21	-59.07	0.0087
S100 ³	-14.31	-52.73	0.0004
SAA ⁴	-10.55	-77.02	<0.0001
P-1NP ⁵	-11.78	13.64	0.0119
OC ⁶	1.94	28.76	0.0143

* P 值来自双侧 Wilcoxon 秩和检验

¹ 抗 CCP 为抗瓜氨酸化肽抗体

² CRP 为 C-反应性蛋白

³ S100 为 S100 A8/9, 吞噬细胞中的 Ca^{++} 结合性钙粒蛋白

⁴ SAA 为血清淀粉样蛋白 A

⁵ P-1NP 为前胶原 1 型 N 末端原肽(propeptide)

⁶ OC 为骨钙蛋白

结论:

与单独的 MTX 相比, RTX+MTX 组中所有所分析标志在 24 周时均显示显著的变化。具体而言, 抗 CCP、CRP、S100 和 SAA 血清水平的变化说明单次短疗程 rituximab 对炎症和自身抗体标志产生深刻影响, 这与观察到的征候及症状的实质性改善是一致的。总免疫球蛋白水平没有受 rituximab 治疗的显著影响。另外, 与 MTX 组相比, RTX+MTX 组中 OC 和 P1NP 血清水平显著增加, 说明 rituximab 在对 RA 征候和症状的影响之外还对骨周转的生物标志具有积极影响, 暗示 rituximab 对骨密度和/或结构损伤有效果。

实施例 2: 动物中的骨重建

rituximab 的活性可以在骨重建动物模型中展示。如此, 将 Sprague-Dawley 大鼠按体重匹配后分成 7 个组, 每组 10 只动物。包括一个基线对照组, 其中大鼠在研究开始时处死; 一个只施用媒介的对照组; 一个 PBS 处理的对照组; 和一个施用已知促进骨生长的化合物的阳性对照组。剩余三个组施用三个剂量水平的 rituximab。

rituximab、阳性对照化合物、PBS 或单独的媒介每天皮下施用一次, 施用 35 天。所有动物在处死前 9 天和 2 天注射钙荧光素(在每个指明的日期注射两次钙荧光素)。测定每周的体重。在 35 天循环结束时, 将动物称重并通过眼眶或心脏穿刺取血。测定血清钙、磷酸盐、骨钙蛋白和 CBC。取出两腿骨(股骨和胫骨)以及腰椎, 清除粘附的软组织, 并保存在 70%乙醇中供评估用。通过外周定量计算 X 射线断层照相术(peripheral quantitative computed tomography) (pQCT; Ferretti, *Bone* 17:353S-364S (1995))、双重能量 X 射线吸收测量术(dual energy X-ray absorptiometry) (DEXA; Laval-Jeantet *et al.*, *Calcif Tissue Intl.* 56:14-18 (1995); Casez *et al.*, *Bone and Mineral* 26:61-68 (1994)和/或组织形态测量术来演示(perform) rituximab 对骨重建的效果。

rituximab 体内施用抑制破骨细胞发生及相关的骨吸收, 并阻断破骨细胞数目和活性的病理性增加, 上述现象可见于模拟人类中骨量减少性病症

的动物模型中。如此,在该模型中 rituximab 或人源化 2H7 较之对照有效增强骨重建。

实施例 3: rituximab 在骨质疏松中的临床研究

诊断为患有骨质疏松的患者可以用 rituximab 治疗。受治患者将经过选择从而不患有 B 细胞恶性肿瘤。

根据下列任何剂量方案对所述患者静脉内(IV)施用 rituximab:

(A) 50mg/m² IV 第 1 天; 150 mg/m² IV 第 8、15 和 22 天

(B) 150mg/m² IV 第 1 天; 375 mg/m² IV 第 8、15 和 22 天

(C) 375 mg/m² IV 于第 1、8、15 和 22 天

(D) 1 g IV 第 1 和 15 天

该 rituximab 疗法可以与其它辅助疗法(诸如治疗破骨细胞相关病症的药剂,如上所述)联用,但优选的是在整个治疗过程中用 rituximab 作为单一药剂治疗患者。使用安慰剂(不含 rituximab 的 rituximab 配制剂溶液)对另一组患者施用对照。

基于由标准化学参数测定的骨成骨细胞改善来确定整体响应率。另外,在生物标志(如实施例 1 所述的)之外,使用骨密度测量术和骨折率(fracture rate)评估作为终点。在如上述治疗的患者中,与安慰剂对照相比,rituximab 或人源化 2H7 的施用改善骨成骨细胞(通过生物标志测定)、改善骨密度测定值、降低骨折率。

实施例 4: 体外形成的破骨细胞的鉴定

TRAP 指酒石酸根抗性的酸性磷酸酶,它可鉴别破骨细胞样细胞。rituximab 可用作 TRAP 测定法中的阳性对照。

对 TRAP 的细胞化学染色广泛用于体内和体外鉴别破骨细胞。在本测试中,将磷酸萘酚 AS-MX 5 mg (Sigma, St. Louis, MO)溶于 0.5 ml N,N-二甲基甲酰胺(Wako)。向该混合物中加入 30 毫克固红紫 LB 盐(Sigma)和 50 ml 含 50 mM 酒石酸钠的 0.1 M 乙酸钠缓冲液(pH 5.0)(TRAP 染色溶液)。在室温下,将细胞用不含 Ca²⁺及 Mg²⁺的磷酸盐缓冲盐水中的 3.7% (v/v)甲醛固定 10 分钟,用乙醇-丙酮(50:50, v:v)再次固定 1 分钟,再与 TRAP 染色溶液一起温育 10 分钟。TRAP 阳性的破骨细胞显示为红色细胞。温育时间不应

超过 10 分钟, 因为破骨细胞之外的细胞随着时间推移变为弱阳性。染色后, 用蒸馏水洗涤细胞, 在显微镜下将具有 3 个或 3 个以上核的 TRAP 阳性多个核细胞作为破骨细胞计数(Nicholson *et al.*, *J. Clin. Invest.* 78: 355 (1986))。在该 TRAP 测定中, rituximab 或人源化 2H7 作为阳性对照是有效的。

实施例 5: CD20 抗体用于牙周病

rituximab 可以用来再生由于牙周疾病而丧失的骨和韧带。在本模型中, 将显示周围颌骨减少 20%到 80%的牙齿进行除牙垢后, 切开形成全厚龈瓣以暴露颌骨和牙根。平整根面以去除菌斑和牙垢。将 2.5% HPMC 凝胶中的 rituximab 以每颗牙 100 mg 的剂量施用到牙周袋, 或者, 将 100 mM 乙酸钠缓冲液 pH 6.0 中的 rituximab 溶液加入骨粉以提供每颗牙 100 mg rituximab 的剂量。将材料完全混合并施用于暴露的牙周袋。在两种情形下, 接下来都封闭龈瓣并通过缝合固定到位。在这个牙周炎模型中, 在使用 rituximab 或人源化 2H7 的情况下, 相对于使用安慰剂而非 rituximab 的对照, 周围颌骨得到至少部分的再生。

实施例 6: 牙植入物

在这个牙植入物模型中可以展示 rituximab 的活性。通过下述方法溶剂流铸聚乳酸-聚乙醇酸薄膜(50:50): 在室温条件下将约 340 mg 的聚合物颗粒 (Polysciences, Warrington, PA)溶于 10 ml 氯仿, 再于室温条件下在慢速气流罩中让溶剂完全蒸发。薄膜为 10 μ m 厚。将每张薄膜切成 80 mm $\times$ 40 mm 的片, 得到约 270-290 mg 剩余聚合物质量。将 rituximab 或人源化 2H7 及兔血清清蛋白的溶液分散在薄膜上, 让液体蒸发。然后将薄膜卷绕在 0.9 mm 直径的克氏钢丝(Kirschner wires)上而提供 1.5 或 3.0 mm 直径的植入物, 并用冷环氧乙烷气体灭菌。将这些植入物, 以及具有安慰剂而非 CD20 抗体的植入物置入大鼠体内。在这个植入物模型中, 相对于对照植入物, 使用 rituximab 或人源化 2H7 预防骨丢失。

实施例 7: 在 OVA 动物中预防骨丢失

使用体内剂量给药测定法(dosing assay), 以雌激素处置组作为对照, 可以在急性卵巢切除动物中展示 rituximab 活性。在这个预防模型中, 将

Sprague-Dawley 大鼠按体重匹配后分成 8 个组。这包括：一个基线对照组，其中大鼠在研究开始时处死；三个对照组（假卵巢切除（假 OVX）+仅媒介；卵巢切除（OVX）+仅媒介；PBS 处置的 OVX）；和一个施用雌激素的对照 OVX 组。剩余三组 OVX 动物施用三个剂量水平的 rituximab。由于卵巢切除术诱发饮食过多，在整个 35 天的研究过程中所有 OVX 动物与假 OVX 动物成对饲养。

每天一次皮下施用 rituximab、阳性对照化合物、PBS 或单独的媒介，施用 35 天。或者，将 rituximab 配制到可植入小丸中，植入 35 天。所有动物，包括假 OVX/媒介和 OVX/媒介组，在处死前 9 天和 2 天均接受钙荧光素腹膜内注射（每一指定日注射钙荧光素 2 次，以保证新生骨的合适标记）。测定每周体重。在 35 天循环结束时，如上所述处理动物的血液和组织。在本模型中，rituximab 或人源化 2H7 相对于对照组有效防止骨丢失。

实施例 8：在慢性 OVX 动物中的骨效应

rituximab 的活性可以在慢性 OVX 动物中展示。在这个模型中，在 0 时间，对数只 Sprague-Dawley 大鼠进行假手术（假 OVX）或卵巢切除术（OVX），并处死 10 只大鼠作为基线对照。每周记录体重。骨消减(bone depletion)6 周后，随机选择 10 只假 OVX 大鼠和 10 只 OVX 大鼠处死，作为消减阶段对照。在剩余动物中，10 只假 OVX 大鼠和 10 只 OVX 大鼠用作安慰剂处置对照。对剩余 OVX 动物用 3 到 5 剂 rituximab 处置 5 周的时间。作为阳性对照，将一组 OVX 大鼠用药剂处置，诸如 PTH，一种已知的该模型中的同化剂(anabolic agent) (Kimmel *et al. Endocrinology* 132:1577-1584 (1993))。切出并收集股骨、胫骨和第 1 到第 4 腰椎以测定对骨形成的效果。使用近端左和右胫骨进行 pQCT 测量、网状骨骨盐密度(BMD)(比重测定)和组织学，而将每一胫骨的中段用于皮层 BMD 或组织学。制备股骨用于中段 pQCT 扫描，然后进行生物力学测试。对于腰椎(LV)，处理 LV2 用于 BMD；制备 LV3 用于未脱钙骨组织学；处理 LV4 用于力学测试。与安慰剂处置的对照相比，用 rituximab 或人源化 2H7 处置的 OVX 动物在上述股骨、胫骨和第 1 到第 4 腰椎测试中的一项或多项中显示骨形成增强的改善。

实施例 9：细胞投递的 CD20 抗体抑制牙槽骨丢失

破骨细胞在进行性牙周炎中负责介导过度的骨吸收。rituximab 抑制破骨细胞的分化和功能。在这个动物模型中，利用本领域已知的方法，对自体细胞进行工程化使其表达 rituximab，并将其永久性植入炎症位点，例如下颌中、患齿邻近的软组织中或牙周韧带中。

在 C3H 小鼠中通过反复注射 LPS 诱发牙周病，其中 LPS 衍生自临床相关的微生物牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)，一种本领域公认的牙周病模型。使用经遗传工程化从而以可调控方式产生 rituximab 的 C₃H₁₀T1/2 鼠成纤维细胞系处置患牙周病的小鼠。通过口服，例如在饮水中提供抗生素来调节 rituximab 的生成。细胞在骨吸收位点局部植入，从而避开了系统施用或反复局部注射生物活性分子的需要。任选的是，在植入细胞之后将抗生素置入牙周袋用于牙周病。这种基于细胞的局部投递 rituximab 的途径利用组织工程来抑制牙槽骨吸收。

此处所用的鼠莫洛尼逆转录病毒载体是得到充分表征的，并且在人或小鼠中无免疫原性。

使用标准原位杂交(ISH)来检测 rituximab 生成，并表征定居到细胞植入物受体的下颌骨或其它骨组织的细胞中的破骨细胞表型。

从以上所述可以理解，虽然为了例示的目的已经描述了本发明的具体实施方案，但可以作出多种修改而不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明除随附权利要求之外不受限制。

<110> 健泰科生物技术公司 (Genentech, Inc.)
SEWELL, K. Lea
QUAN, Joanne

<120> 骨病症的治疗

<130> 22338-01402

<150> US 60/656, 943
<151> 2005-02-28

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 1

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人源化 2H7 轻链可变域

<400> 2

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

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

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

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 3

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 2H7 CDR1

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 2H7 CDR2

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 2H7 CDR3

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 7

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

			85						90						95			
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp			
			100					105					110					

Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115					120											

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 2H7 重链可变域

<400> 8

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
1				5				10					15					

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr			
		20						25					30					

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

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

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
65					70					75					80			

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

Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp			
		100						105					110					

Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115					120											

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人亚型 III 共有序列

<400> 9

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
1				5				10					15					

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr			
		20						25					30					

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR1

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 1 5 10

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR2

<400> 11

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

Gly

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR3

<400> 12

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 13
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人源化 2H7 轻链序列

<400> 13

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

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

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

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

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

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14
<211> 452
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 2H7 重链序列

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 15
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人源化 2H7 重链序列

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 16

<211> 285

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 16

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
35 40 45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
50 55 60

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
85 90 95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
115 120 125

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

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
145 150 155 160

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
165 170 175

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
180 185 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
195 200 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
210 215 220

Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240

Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
245 250 255

Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
260 265 270

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
275 280 285

<210> 17

<211> 309

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 17

Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys
1 5 10 15

Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro
20 25 30

Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu
35 40 45

Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala
50 55 60

Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu
65 70 75 80

Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala
85 90 95

Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala
100 105 110

Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe
115 120 125

Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro
130 135 140

Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly
145 150 155 160

Met Asn Leu Arg Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp
165 170 175

Ser Asp Thr Pro Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp
180 185 190

Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys

195	200	205
Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu 210	215	220
Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys 225	230	235 240
Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys 245	250	255
Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala 260	265	270
Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro 275	280	285
Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly 290	295	300
Ala Leu Lys Leu Leu 305		

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> BAF 拮抗剂

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3).. (3)
 <223> 除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5).. (5)
 <223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7).. (12)
 <223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14).. (15)
 <223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (16).. (16)
 <223> X 可以是 L、F、I 或 V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17).. (17)
 <223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<400> 18

Xaa	Cys	Xaa	Asp	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10					15		

Xaa

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 式 1 序列

<400> 19

Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ala	Trp	Val	Pro	Cys	Ser	Val	Leu
1				5				10					15		

Lys

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 式 1 序列

<400> 20

Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	His	Trp	Val	Pro	Cys	Gly	Leu	Leu
1				5				10					15		

Arg

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 式 1 序列

<400> 21

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Trp Val Pro Cys Glu Met Leu
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 式1序列

<400> 22

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ser Trp Val Pro Cys His Met Leu
1 5 10 15

Arg

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 式1序列

<400> 23

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Ala Cys Gly Leu Leu
1 5 10 15

Arg

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 式1序列

<400> 24

Gln Cys Phe Asp Arg Leu Asn Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu Lys
1 5 10 15

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> BAFF 拮抗剂式 II

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (9)
<223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (15)
<223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)
<223> X 可以是除半胱氨酸以外的任何氨基酸

<400> 25

Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Val Xaa Xaa Trp Val Pro Cys Xaa Xaa Leu
1 5 10 15

Xaa

<210> 26
<211> 184
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 26

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
20 25 30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
35 40 45

Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
 50 55 60
 Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
 85 90 95
 Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
 100 105 110
 Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
 115 120 125
 Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
 130 135 140
 Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
 165 170 175
 Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 180

<210> 27
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 微型 BR3

<400> 27

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
 1 5 10 15
 Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg
 20 25

<210> 28
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> hu2H7.v138 轻链区

<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 29

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> hu2H7.v138 重链区

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		85	90	95
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp	100		105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	115		120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	130		135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	145	150	155	160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	180		185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn	195		200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser	210	215	220	
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	225	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260		265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	275		280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr	290		295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	305	310	315	320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Ala Ala Leu Pro Ala Pro		325	330	335
Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	340		345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val	355		360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	370	375	380	

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人源化 2H7 抗体轻链可变区

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 31
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 2H7.v511 轻链区

<400> 31

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

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

<210> 32
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 2H7.v511 重链区

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Ala Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
	370						375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
	385					390				395					400	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
				405					410					415		
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
			420					425					430			
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
		435					440					445				
Ser	Pro	Gly	Lys													
	450															

轻链可变域的序列比对

	FR1	CDR1	
	10	20	30 40
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	RASSSVS-YMH	WYQQKP
	* * * *		
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLASVGDRTITC	RASSSVS-YMH	WYQQKP
		* * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLASVGDRTITC	RASQISNYLA	WYQQKP
	FR2	CDR2	FR3
	50	60	70 80
2H7	GSSPKPWIY	APSNLAS	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA
	** *	*	*** ****
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	APSNLAS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
	*	* * *	
hum KI	GKAPKLLIY	AASSLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
	CDR3	FR4	
	90	100	
2h7	EDAATYYC	QQWSFNPPT	FGAGTKLELKR
	*		* * *
HU2h7.V16	EDFATYYC	QQWSFNPPT	FGQGTKVEIKR

HUM ki	EDFATYYC	QQYNSLEWT	FGQGTKVEIKR

图 1A

重链可变域的序列比对

	FR1	CDR1	
	10	20	30
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	GYTFTSYNMH	WVKQT
	*** ** * * * * *		* *
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GYTFTSYNMH	WVRQA
		* * * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQA
	FR2	CDR2	FR3
	50	a	60
2H7	PRQGLEWIG	AIYPGNGDTSYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYM
	** *		** ** * * *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG	AIYPGNGDTSYNQKFKG	RFTISVDKSKNTLYL
	*	* * * * *	* *
hum III	PGKGLEWVA	VISGDGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYL
		CDR3	FR4
	abc	90	100abcde
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	VVYYSNSYWYFDV	WGTGTTVTIVSS
	** * * *		*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	VVYYSNSYWYFDV	WGQGLVTVSS
		* * * * *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	GRVGYSLY---DY	WGQGLVTVSS

图 1B

hu2H7.v16 和 hu2H7.v138 轻链的比对

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP				
hu2H7.v138	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP				
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG				
hu2H7.v138	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG				
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD				
hu2H7.v138	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD				
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL				
hu2H7.v138	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL				
	210				
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC				
hu2H7.v138	SSPVTKSFNRGEC				

图 2

hu2H7.v16 和 hu2H7.v138 重链的比对

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA				
hu2H7.v138	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA				
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16	IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV				
hu2H7.v138	IYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV				
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16	YYSNSYWFYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL				
hu2H7.v138	YYSASYWFYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL				
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16	VKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT				
hu2H7.v138	VKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT				
	210	220	230	240	250
hu2H7.v16	QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP				
hu2H7.v138	QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP				
	260	270	280	290	300
hu2H7.v16	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ				
hu2H7.v138	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ				
	310	320	330	340	350
hu2H7.v16	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE				
hu2H7.v138	YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAAPAPIAATISKAKGQPRE				
	360	370	380	390	400
hu2H7.v16	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP				
hu2H7.v138	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP				
	410	420	430	440	450
hu2H7.v16	PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				
hu2H7.v138	PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				

图 3