



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111615520 A

(43)申请公布日 2020.09.01

(21)申请号 201880077727.6

(22)申请日 2018.11.28

(30)优先权数据

62/593,830 2017.12.01 US

62/732,985 2018.09.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/062829 2018.11.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/108639 EN 2019.06.06

(83)生物保藏信息

PTA-124323 2017.07.26

PTA-124324 2017.07.26

(71)申请人 辉瑞大药厂

地址 美国纽约州

申请人 加利福尼亚大学董事会

(72)发明人 R·格罗斯 W·B·斯奈德 X·曹

R·J·邓恩 J·达尔波尔托

M·卡林

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 张小勇

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书5页 说明书117页

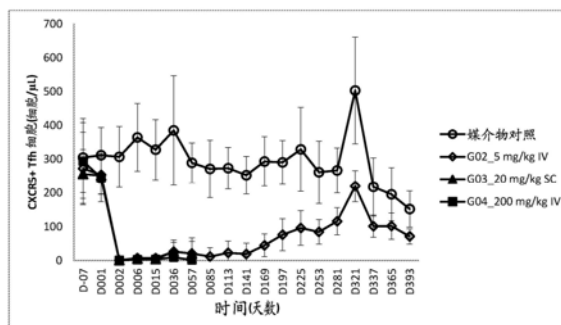
序列表62页 附图12页

(54)发明名称

抗CXCR5抗体及其组合物和用途

(57)摘要

本发明提供了特异性结合CXCR5的抗体及其抗原结合片段。该抗体可以是非岩藻糖基化的并与其他方面相同的岩藻糖基化抗体相比显示出增加的ADCC。本发明包括抗体的用途和相关使用方法。



1. 分离的抗体或其抗原结合片段, 其特异性结合CXCR5, 其中抗体是选自以下的至少一种抗体:

a) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1; 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2; 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3; 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1; 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2; 和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H3;

b) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1; 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2; 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3; 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1; 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2; 和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-H3;

c) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1; 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L2; 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L3; 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H1; 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H2; 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H3;

d) 包含如下的抗体: 包含由保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物编码的氨基酸序列的VL和包含由保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物编码的氨基酸序列的VH;

e) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL, 和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH;

f) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL, 和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH;

g) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VL, 和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VH;

h) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL, 和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH;

i) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL, 和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH;

j) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL, 和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH;

k) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL, 和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH;

l) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LC, 和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HC;

m) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的LC, 和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HC;

n) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的LC, 和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HC;

o) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LC, 和包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HC;

p) 包含如下的抗体:由SEQ ID NO:95的核酸序列编码的VL,和由SEQ ID NO:96的核酸序列编码的VH;和

q) 包含如下的抗体:由SEQ ID NO:97的核酸序列编码的LC,和由SEQ ID NO:98的核酸序列编码的HC。

2. 分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合C-X-C-趋化因子受体5 (CXCR5),其中抗体或其抗原结合片段是选自以下的至少一种抗体:

a) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基不是亮氨酸的所述表位;

b) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基是苏氨酸的所述表位;

c) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基不是天冬氨酸的所述表位;

d) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基是丙氨酸的所述表位;

e) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸和在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5表位,但是不结合其中所述亮氨酸被苏氨酸取代和/或所述天冬氨酸被丙氨酸取代的所述表位;

f) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基不是亮氨酸的hCXCR5或其片段;

g) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基是苏氨酸的hCXCR5或其片段;

h) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基不是天冬氨酸的hCXCR5或其片段;

i) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基是丙氨酸的hCXCR5或其片段;和

j) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸和在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5或其片段,但是不结合其中所述亮氨酸被苏氨酸取代和/或所述天冬氨酸被丙氨酸取代的hCXCR5或其片段。

3. 分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合C-X-C-趋化因子受体5 (CXCR5),其中抗体或其抗原结合片段是选自以下的至少一种抗体:

a) 抗体或其抗原结合片段,其结合在人B细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约6.60pM,其标准差为约正或负2.33pM;

b) 抗体或其抗原结合片段,其结合在人循环滤泡T辅助细胞样细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约5.89pM,其标准差为约正或负1.40pM;

c) 抗体或其抗原结合片段,其结合在人滤泡T辅助(Tfh)细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力和EC50是约10.6pM;

d) 抗体或其抗原结合片段,其结合在食蟹猴B细胞上表达的cynoCXCR5,表观亲和力和EC50是约1.32pM;

e) 抗体或其抗原结合片段,其结合在食蟹猴Tfh样细胞上表达的cynoCXCR5,表观亲和力和EC50是约10.5pM;

f) 抗体或其抗原结合片段,其在cAMP报告分子测定法中拮抗CXCR5-CXCL13信号传导,EC50是约961pM;

g) 抗体或其抗原结合片段,其对表达hCXCR5的人B细胞表现出ADCC活性,EC50是约2.01pM,其标准差为约正或负2.28pM;

h) 抗体或其抗原结合片段,其对表达hCXCR5的人Tfh样细胞表现出ADCC活性,EC50是约4.28pM,其标准差为约正或负2.88pM;

i) 抗体或其抗原结合片段,其对表达hCXCR5的人Tfh细胞表现出ADCC活性,EC50是约0.11pM;

j) 抗体或其抗原结合片段,其对表达cynoCXCR5的食蟹猴B细胞表现出ADCC活性,EC50是约15.3pM,其标准差为约正或负11.7pM;

k) 抗体或其抗原结合片段,其结合hCXCR5但未检测到结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7和XCR1;

l) 抗体或其抗原结合片段,其抑制CXCR5与CXCL13的结合;

m) 抗体或其抗原结合片段,其结合CXCR5+人B细胞,表观亲和力EC50小于约26pM,但不结合表达CXCR5小鼠、大鼠或兔直系同源物的细胞;

n) 抗体或其抗原结合片段,其拮抗CXCL13对由毛喉素触发的cAMP释放的抑制作用;

o) 抗体或其抗原结合片段,其触发人供体和食蟹猴PBMC和人供体TMC中表达CXCR5的细胞的ADCC;

p) 抗体或其抗原结合片段,其结合人CXCR5但不结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7或XCR1;

q) 抗体或其抗原结合片段,其耗尽外周血中的B细胞;

r) 抗体或其抗原结合片段,其耗尽外周血中的Tfh样细胞;

s) 抗体或其抗原结合片段,其耗尽脾脏中的真正Tfh细胞;和

t) 抗体或其抗原结合片段,其损害体液免疫记忆应答。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段表现出以下生物学活性中的至少一种:

a) 结合CXCR5+人B细胞,表观亲和力EC50小于约26pM,但不结合表达CXCR5小鼠、大鼠或兔直系同源物的细胞;

b) 拮抗CXCL13对由毛喉素触发的cAMP释放的抑制作用;

c) 触发人供体和食蟹猴PBMC和人供体TMC中表达CXCR5的细胞的ADCC;

d) 结合人CXCR5但不结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、

CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7或XCR1；

- e) 耗尽外周血中的B细胞；
- f) 耗尽外周血中的Tfh样细胞；
- g) 耗尽脾脏中的真正Tfh细胞；或
- h) 损害体液免疫记忆应答。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体，其中所述抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的。

6. 分离的核酸，其编码根据权利要求1-5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

7. 分离的核酸，编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VH、VL或两者，其中所述核酸包含：SEQ ID NO:95的核酸序列、SEQ ID NO:96的核酸序列或两者。

8. 分离的核酸，编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的重链、轻链或两者，其中所述核酸包含：SEQ ID NO:97的核酸序列、SEQ ID NO:98的核酸序列或两者。

9. 分离的核酸，编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VH、VL或两者，其中所述核酸包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物的核酸序列、保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物的核酸序列或两者。

10. 载体，包含根据权利要求6-9中任一项所述的核酸。

11. 宿主细胞，包含根据权利要求10所述的载体。

12. 根据权利要求11所述的宿主细胞，其中所述宿主细胞是选自CHO细胞、COS细胞、HEK-293细胞、NS0细胞、**PER.C6®**细胞或Sp2.0细胞的哺乳动物细胞。

13. 根据权利要求12所述的宿主细胞，其中所述细胞缺乏功能性 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)。

14. 根据权利要求13所述的宿主细胞，其中所述细胞是**Potelligent®** CHOK1SV细胞或Lec13 CHO细胞。

15. 制备抗体或其抗原结合片段的方法，包括使根据权利要求14所述的**Potelligent®** CHOK1SV细胞处在其中所述抗体或其抗原结合片段由所述宿主细胞表达并被非岩藻糖基化的条件下。

16. 根据权利要求15所述的方法，还包括分离所述抗体或其抗原结合片段。

17. 根据权利要求15所述的非岩藻糖基化的抗体或其抗原结合片段，其中与岩藻糖基化的其他方面相同的抗体或其抗原结合片段相比，所述抗体表现出增强的ADCC活性。

18. 药物组合物，包含根据权利要求1-5和17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的运载体或赋形剂。

19. 根据权利要求1-5、17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和根据权利要求18所述的药物组合物，其用于治疗免疫疾病、病症或病况。

20. 根据权利要求1-5、17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求18所述的药物组合物用于治疗免疫疾病、病症或病况的用途。

21. 在有此需要的人受试者中治疗或预防由CXCR5介导的免疫疾病、病症或病况的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的根据权利要求18所述的药物组合物，其中所述疾病、病症或病况选自炎性反应，例如炎性皮肤病疾病包括牛皮癣和皮炎(例如特应性皮炎)；皮

肌炎;系统性硬皮病和硬化;与炎性肠病(如克罗恩病和溃疡性结肠炎)相关的反应;呼吸窘迫综合征(包括成人呼吸窘迫综合征;ARDS);皮炎;脑膜炎;脑炎;葡萄膜炎;结肠炎;胃炎;肾小球肾炎;例如湿疹与哮喘的过敏性疾病以及其他涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病况;动脉粥样硬化;白细胞粘附不足;类风湿关节炎(RA);系统性红斑狼疮(SLE);糖尿病(例如I型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化症;雷诺综合征;自身免疫性甲状腺炎;过敏性脑脊髓炎;干燥综合征;幼发型糖尿病;与由结核、结节病、多发性肌炎、肉芽肿病和血管炎中常见的细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏有关的免疫应答;韦格纳病;恶性贫血(阿迪森氏病);涉及白细胞渗出的疾病;中枢神经系统(CNS)炎性疾病;多器官损伤综合征;溶血性贫血(包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯阳性贫血);重症肌无力;抗原-抗体复合物介导的疾病;抗肾小球基底膜病;抗磷脂综合征;过敏性神经炎;格雷夫斯病;兰伯特-伊顿肌无力综合征;天疱疮性大疱;天疱疮;自身免疫多发性内分泌病;白癜风;瑞特氏病;僵人综合征;白塞病;巨细胞动脉炎;免疫复合物肾炎;IgA肾病;IgM多发性神经病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症和自身免疫性溶血性疾病;桥本甲状腺炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性血友病;自身免疫性淋巴组织增生综合征(ALPS);自身免疫性葡萄膜视网膜炎;吉兰-巴雷综合征;肺出血-肾炎综合征;混合性结缔组织病;自身免疫性相关不育;结节性多发性动脉炎;斑秃;特发性粘液水肿;移植物抗宿主病;肌肉营养不良(Duchenne、Becker、强直性、肢带、面肩肱、先天性、眼咽、远端、Emery-Dreifuss),和控制表达CXCR5的癌细胞的增殖,例如胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、T细胞白血病和B细胞白血病。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述疾病是SLE或类风湿性关节炎。

23. 根据权利要求1-5或17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗免疫疾病、病症或病况的药物中的用途。

24. 使用根据权利要求1-5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段检测样品、组织或细胞中的CXCR5的方法,包括使样品、组织或细胞与抗体接触并检测抗体。

25. 在有此需要的受试者中降低CXCR5的生物学活性的方法,所述方法包括施用治疗有效量的根据权利要求1-5或17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或者根据权利要求18所述的药物组合物。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中抗体介导至少一种表达CXCR5的细胞的耗尽,所述细胞选自脾脏中的Tfh细胞、外周血中的B细胞和外周血中的Tfh样细胞。

27. 在有此需要的受试者中抑制体液免疫应答的方法,方法包括施用治疗有效量的根据权利要求1-5或17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或者根据权利要求18所述的药物组合物。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中抗体介导至少一种表达CXCR5的细胞的耗尽,所述细胞选自脾脏中的Tfh细胞、外周血中的B细胞和外周血中的Tfh样细胞。

抗CXCR5抗体及其组合物和用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2017年12月1日提交的美国专利申请序列号62/593,830和2018年9月18日提交的美国专利申请序列号62/732,985的优先权,各自内容通过引用全部并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本说明书还通过引用并入了于2018年11月28日随此提交的序列表。根据37 C.F.R. §1.52(e)(5),标识为PC72320A_Seq_Listing_ST25.txt的序列表文本文件为112,891字节并创建于2018年11月15日。随此电子提交的序列表不超出说明书的范围并因此不含新的主题。

[0005] 联合研究声明的各方

[0006] 本发明是由联合研究协议的以下所列方或代表以下各方完成的。联合研究协议于请求保护的发明完成之日或之前生效,并且由于在联合研究协议范围内开展的活动而完成了请求保护的发明。联合研究协议的各方是代表其SAN DIEGO CAMPUS的THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA和PFIZER INC。

[0007] 领域

[0008] 本发明涉及特异性结合5型C-X-C趋化因子受体(CXCR5)的抗体及其抗原结合片段,及其组合物、方法和用途。抗体是岩藻糖基化的(fucosylated)和/或非岩藻糖基化的(afucosylated),并可以表现出改变的效应子功能。

[0009] 背景

[0010] 5型C-X-C趋化因子受体(CXCR5)(也称为CD185或伯基特淋巴瘤受体1(BLR1))是由B细胞、真正滤泡T辅助细胞(Tfh)细胞和循环Tfh样细胞(在本文中可互换地称为“cTfh”和“Tfh样”细胞)表达的天然存在的G蛋白偶联受体。CXCR5在免疫应答中起重要作用并且是治疗自身免疫疾病(例如系统性红斑狼疮(SLE))的潜在靶标。

[0011] 生发中心(GC)(体液免疫应答的关键组分)是抗原激活的B细胞增殖、分化并经历其产生的抗体的体细胞超突变和免疫球蛋白(Ig)类转换的部位。真正Tfh细胞提供指导性信号以协助该过程,最终以产生亲和力成熟的抗体告终。GC反应的体液“记忆”由维持抗体水平的长寿浆细胞和记忆B细胞维持,记忆B细胞在受到抗原再次攻击后,在记忆Tfh细胞的同源帮助下触发次级GC反应,从而导致产生更多的高亲和力浆细胞(McHeyzer-Williams等人,2011,Nature Rev.Immunol.12(1):24-34)。循环Tfh样细胞(以下称为“Tfh样”或“cTfh”)被认为在再次遇到抗原时同样分化为真正Tfh细胞以支持这些记忆应答(Crotty等人,2011,Annu.Rev.Immunol.29:621-663)。

[0012] 重要的是,自反应性B细胞的产生也可以源于GC反应,产生了不利后果。实际上,许多慢性、全身性自身免疫性疾病,例如SLE、RA、肌炎、干燥综合征、ANCA相关血管炎和硬皮病,都显示出自身反应性体液应答的证据。例如作为这些疾病的标志的许多自身抗体具有高亲和力、体细胞突变和Ig转换,表明它们是由自身反应性GC反应引起的(Vinuesa等人,2009,Nature Rev.Immunol.9(12):845-857)。另外,在患有许多这些自身免疫性疾病的患

者的外周血中已检测到循环Tfh样细胞的频率增加,其水平通常与自身抗体滴度和/或疾病严重程度相关(Tangye等人,2013,Nature Rev.Immunol.13(6):412-426)。总而言之,这些数据突出了B细胞、真正Tfh细胞和循环的Tfh样细胞作为许多系统性自身免疫疾病的潜在治疗靶标。

[0013] CXCR5由B细胞、真正Tfh细胞和循环Tfh样细胞表达,并沿着CXCR5配体CXCL13的梯度介导其向GC反应的运输和参与(Vinuesa和Cyster,2011,Immunity 35(5):671-680;Ansel等人,1999,J.Exp.Med.190(8):1123-1134;Ansel等人,2000,Nature 406(6793):309-314;Cyster等人,1999,Curr.Top.Microbiol.Immunol.246:87-92;Hardtke等人,2005,Blood 106(6):1924-1931;Haynes等人,2007,J.Immunol.179(8):5099-5108)。这样,靶向CXCR5可具有治疗自身免疫性疾病的治疗益处。

[0014] 另外,靶向CXCR5在以表达CXCR5的细胞增殖为特征的癌症中也可以具有治疗益处,所述癌症例如胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、T细胞白血病和B细胞白血病。

[0015] 发明概述

[0016] 本申请公开了分离的抗体及其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5(5型C-X-C趋化因子受体)。在某些方面,抗体及其抗原结合片段结合CXCR5并降低CXCR5与CXCL13的结合。在其他方面,抗体可以是岩藻糖基化的,但是更优选地,它们是非岩藻糖基化的。在某些方面,抗体及其抗原结合片段表现出改变的效应子功能。在某些方面,与在其他方面相同但岩藻糖基化的抗体及其抗原结合片段相比,所述抗体及其抗原结合片段是非岩藻糖基化的并且表现出增加的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0017] 在某些方面,本公开内容提供了分离的抗体及其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5,其中抗体及其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的编号在氨基酸残基编号11(L11)是亮氨酸(Leu;L)的表位。

[0018] 在另一方面,本公开内容提供了分离的抗体及其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5,其中抗体及其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的编号在氨基酸残基编号22是天冬氨酸(Asp;D)的表位。

[0019] 本领域技术人员将仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述的本发明的特定实施方案的许多等同形式。这些等同形式旨在被以下实施方案(E)涵盖。

[0020] E1.分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合C-X-C趋化因子受体5(CXCR5),其中抗体或其抗原结合片段结合在人CXCR5(hCXCR5)或食蟹猴CXCR5(cynoCXCR5)的N结构域内的表位。

[0021] E2.E1的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合在根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号hCXCR5的氨基酸残基1-50内的表位,或结合在根据SEQ ID NO:33的编号cynoCXCR5的氨基酸残基1-50内的表位。

[0022] E3.E1-E2中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的表位。

[0023] E4.E1-E3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的表位。

[0024] E5.E1-E4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸和在氨基酸残基

编号22处是天冬氨酸的表位。

[0025] E6.E1-E5中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的表位,但是当所述残基不是亮氨酸时不结合hCXCR5。

[0026] E7.E1-E6中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的表位,但是当所述残基是苏氨酸时不结合hCXCR5。

[0027] E8.E1-E7中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的表位,但是当所述残基不是天冬氨酸时不结合hCXCR5。

[0028] E9.E1-E8中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的表位,但是当所述残基是丙氨酸时不结合hCXCR5。

[0029] E10.根据E1-E9中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸和在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的表位,但不结合其中亮氨酸被苏氨酸取代和/或天冬氨酸被丙氨酸取代的所述表位。

[0030] E11.E1-E10中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合在人B细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约6.60pM,其标准差为约正或负2.33pM。

[0031] E12.E1-E11中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合在人循环滤泡性T辅助样(Tfh样)细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约5.89pM,其标准差为约正或负1.40pM。

[0032] E13.E1-E12中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合在人滤泡T辅助细胞(Tfh)上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约10.6pM。

[0033] E14.E1-E13中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合在食蟹猴B细胞上表达的cynoCXCR5,表观亲和力EC50是约1.32pM。

[0034] E15.E1-E14中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合在食蟹猴Tfh样细胞上表达的cynoCXCR5,表观亲和力EC50是约10.5pM。

[0035] E16.E1-E15中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段在cAMP报告基因测定法中拮抗CXCR5-CXCL13信号传导,EC 50是约961pM。

[0036] E17.E1-E16中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段对表达hCXCR5的人B细胞表现出ADCC活性,EC50是约2.01pM,其标准差为约正或负2.28pM。

[0037] E18.E1-E17中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段对表达hCXCR5的人Tfh样细胞表现出ADCC活性,EC50是约4.28pM,其标准差为约正或负2.88pM。

[0038] E19.E1-E18中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段对表达hCXCR5的人Tfh细胞表现出ADCC活性,EC50是约0.11pM。

[0039] E20.E1-E19中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段对表达cynoCXCR5的食蟹猴B细胞表现出ADCC活性,EC50是约15.3pM,其标准差为约正或负11.7pM。

[0040] E21.E1-E20中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合hCXCR5,但未检测到结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7和XCR1。

[0041] E22.E1-E21中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段耗尽外周血中的B细胞。

[0042] E23.E22的抗体或其抗原结合片段,其中外周血中B细胞的耗尽是可逆的。

[0043] E24.E1-E23中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段耗尽外周血中的Tfh样细胞。

[0044] E25.E1-E24中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段耗尽脾脏中的Tfh细胞。

[0045] E26.E1-E24中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段损害体液免疫记忆应答。

[0046] E27.E26的抗体或其抗原结合片段,其中受损的体液免疫记忆应答是针对食蟹猴中的破伤风类毒素。

[0047] E28.E1-E27中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段抑制CXCR5与CXCL13的结合。

[0048] E29.E1-E28中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段抑制CXCL13对细胞中cAMP产生的抑制作用,否则所述细胞被毛喉素触发而导致与不存在抗体或其抗原结合片段时cAMP的水平相比cAMP水平升高。

[0049] E30.E1-E29中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段抑制CXCL13对cAMP产生的抑制作用,EC₅₀是约961pM。

[0050] E31.E30的抗体或其抗原结合片段,其中对CXCL13抑制的最大抑制作用是至少约60%、70%或80%。

[0051] E32.E1-E31中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合表达CXCR5的人B细胞(例如CXCR5⁺人B细胞),表观亲和力EC₅₀小于约26pM,但不结合表达CXCR5小鼠、大鼠或兔直系同源物的细胞。

[0052] E33.E1-E32中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段触发人供体和食蟹猴外周血单核细胞(PBMC)和人供体扁桃体单核细胞(TMC)中表达CXCR5的细胞的ADCC。

[0053] E34.分离的抗体,其特异性结合hCXCR5并与E1-E33中任一项的抗体或其抗原结合片段竞争。

[0054] E35.E1-E34中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段结合CXCR5⁺人B细胞,表观亲和力EC₅₀小于约26pM,但是基本上不结合表达CXCR5直向同源物的细胞。在一些实施方案中,例如基于本文所述的任何测定法,抗体或其抗原结合片段显示未检测到结合表达CXCR5直向同源物的细胞;或结合表达CXCR5直向同源物的细胞,表观亲和力EC₅₀是结合hCXCR5的至少10,000倍。

[0055] E36.E1-E35中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1;包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2;包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3;包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1;包含

SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2;和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H3。

[0056] E37.E1-E36中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1;包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2;包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3;包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2;和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-H3。

[0057] E38.E1-E37中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:CDR-L1氨基酸序列SEQ ID NO:14;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L2;包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L3;包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H1;包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H2;和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H3。

[0058] E39.E1-E38中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含选自SEQ ID NO:1、5、13、35、37、48-51、39和58-62的氨基酸序列的氨基酸序列的VL,和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、17、18、36、40、53-57和63的氨基酸序列的氨基酸序列的VH。

[0059] E40.E1-E39中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含选自SEQ ID NO:1、5、13、35、37、48-51、39和58-62的氨基酸序列的氨基酸序列的VL,和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、17、18、36、40、53-57和63的氨基酸序列的氨基酸序列的VH。

[0060] E41.E1-E40中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含由保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物编码的氨基酸序列的VL和包含由保藏在ATCC具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物编码的氨基酸序列的VH。

[0061] E42.E1-E35和E39-E40中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH。

[0062] E43.E1-E35和E38-E40中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH。

[0063] E44.E1-E35和E38-E40中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH。

[0064] E45.E1-E36和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH。

[0065] E46.E1-E36和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VH。

[0066] E47.E1-E36和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH。

[0067] E48.E1-E36和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结

合片段包含如下:包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH。

[0068] E49.E1-E36和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH。

[0069] E50.E1-E35、E37和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH。

[0070] E51.E1-E35、E37和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH。

[0071] E52.E1-E35、E37和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HC。

[0072] E53.E1-E35和E38-E40中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HC。

[0073] E54.E1-E35、E37和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HC。

[0074] E55.E1-E35、E37和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HC。

[0075] E56.E1-E35、E37和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:由SEQ ID NO:95的核酸序列编码的VL,和由SEQ ID NO:96的核酸序列编码的VH。

[0076] E57.E1-E35、E37和E39-E41中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含如下:由SEQ ID NO:97的核酸序列编码的LC,和由SEQ ID NO:98的核酸序列编码的HC。

[0077] E58.E1-E57中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含VL框架序列和VH框架序列,并且其中VL框架序列或VH框架序列的之一或两者与衍生其的人种系序列形式至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同并且其中衍生出VL框架序列的人种系VL序列选自DPK9、DPK12、DPK18、DPK24、HK102_V1、DPK1、DPK8、DPK3、DPK21、Vg_38K、DPK22、DPK15、DPL16、DPL8、V1-22、Vλ共有序列、Vλ1共有序列、Vλ3共有序列、Vκ共有序列、Vκ1共有序列、Vκ2共有序列和Vκ3,并且其中衍生出VH框架序列的人种系VH序列选自DP54、DP47、DP50、DP31、DP46、DP71、DP75、DP10、DP7、DP49、DP51、DP38、DP79、DP78、DP73、VH3、VH5、VH1和VH4。

[0078] E59.E1-E58中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的。

[0079] E60.E59的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段表现出增强的ADCC。

[0080] E61.分离的抗体或其抗原结合片段,包含VH的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列,所述VH包含选自SEQ ID NO:6、7、8、25、17、18、23、27、52、53、54、55、56、57和63的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0081] E62.分离的抗体或其抗原结合片段,包含VL的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列,所述VL包含选自SEQ ID NO:1、2、13、22、24、26、47、48、49、50、51、58、59、60、61和62的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0082] E63.E1-E62中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

[0083] E64.E1-E62中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

[0084] E65.E1-E64中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含一个或多个以下氨基酸取代:

[0085] CDR-L1中的1、2、3、4、5或6个取代为人种系VL序列的对应残基,

[0086] CDR-L2中的1、2、3、4或5个取代为人VL种系序列的对应残基,

[0087] CDR L3中的1、2、3、4、5或6个取代为人种系VL序列的对应残基,

[0088] CDR-H1中的1、2、3、4、5或6个取代为人种系VH序列的对应残基,

[0089] CDR H2中的1、2、3、4、5、6、7或8个取代为人种系VH序列的对应残基,

[0090] 其中人种系VL序列选自DPK9、DPK12、DPK18、DPK24、HK102_V1、DPK1、DPK8、DPK3、DPK21、Vg_38K、DPK22、DPK15、DPL16、DPL8、V1-22、V κ 1共有序列、V κ 2共有序列和V κ 3共有序列,和人种系VH选自DP54、DP47、DP50、DP31、DP46、DP71、DP75、DP10、DP7、DP49、DP51、DP38、DP79、DP78、DP73、VH3、VH5、VH1和VH4。

[0091] E66.E61-E65中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系VH序列的VH框架序列,所述人种系VH序列选自DP54、DP47、DP50、DP31、DP46、DP71、DP75、DP10、DP7、DP49、DP51、DP38、DP79、DP78、DP73、VH3、VH5、VH1和VH4。

[0092] E67.E61-E66中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人VH3种系序列的框架VH序列。

[0093] E68.E61-E67中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系VH序列的框架VH序列,所述人种系VH序列选自DP54、DP47、DP50、DP31、DP46、DP49和DP51。

[0094] E69.E61-E68中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系VH序列的框架VH序列,所述人种系VH序列选自DP54、DP47、DP50和DP31。

[0095] E70.E61-E69中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系DP54序列的VH框架序列。

[0096] E71.E61-E70中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系VL序列的VL框架序列,所述人种系VL序列选自DPK9、DPK12、DPK18、DPK24、HK102_V1、DPK1、DPK8、DPK3、DPK21、Vg_38K、DPK22、DPK15、DPL16、DPL8、V1-22、V κ 共有序列、V κ 1共有序列、V κ 2共有序列和V κ 3共有序列。

[0097] E72.E61-E71中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系VL序列的VL

框架序列,所述VL框架序列选自DPK9、DPK12、DPK18、DPK24、HK102_V1、DPK1、DPK8、DPK3、DPK21、Vg_38K、DPK22、DPK15、Vk共有序列、Vk1共有序列、Vk2共有序列和Vk3。

[0098] E73.E61-E72中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系Vk1序列的VL框架序列。

[0099] E74.E61-E73中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系VL序列的VL框架序列,所述人种系VL序列选自DPK9、HK102_V1、DPK1和DPK8。

[0100] E75.E61-E74中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含衍生自人种系DPK9序列的VL框架序列。

[0101] E76.E61-E75中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VL框架序列和VH框架序列,并且其中VL框架序列或VH框架序列的之一或二者与衍生其的人种系序列至少90%相同。

[0102] E77.E61-E76中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VL框架序列和VH框架序列,并且其中VL框架序列或VH框架序列的之一或两者与衍生其的人种系序列至少66%、76%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0103] E78.E61-E77中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VL框架序列和VH框架序列,并且其中VL框架序列或VH框架序列的之一或二者与衍生其的人种系序列相同。

[0104] E79.E61-E78中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:6至少90%相同的氨基酸序列。

[0105] E80.E61-E79中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:6至少92%相同的氨基酸序列。

[0106] E81.E61-E80中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0107] E82.E61-E81中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:1具有至少66%相同的氨基酸序列。

[0108] E83.E61-E82中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:1至少66%、76%、80%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%与相同的氨基酸序列。

[0109] E84.E61-E83中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含VL,所述VL包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0110] E85.E1-E84中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含Fc结构域。

[0111] E86.E85的抗体或其抗原结合片段,其中Fc结构域是IgA(例如IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgM或IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc结构域。

[0112] E87.E86的抗体或其抗原结合片段,其中Fc结构域是IgG的Fc结构域。

[0113] E88.E87的抗体或其抗原结合片段,其中IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0114] E89.E88的抗体或其抗原结合片段,其中IgG是IgG1。

[0115] E90.E1-E89中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:29至少90%相同的氨基酸序列。

[0116] E91.E1-E89中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:29至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0117] E92.E1-E89中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含重链,所述重链包含SEQ ID

NO:29的氨基酸序列。

[0118] E93.E1-E93中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含LC,所述LC包含与SEQ ID NO:28至少90%相同的氨基酸序列。

[0119] E94.E1-E93中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含LC,所述LC包含与SEQ ID NO:28至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0120] E95.E1-E94中任一项的抗体或其抗原结合片段,包含LC,所述LC包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0121] E96.分离的抗体或其抗原结合片段,包含由保藏在ATCC并具有ATCC保藏号PTA-124323的质粒的插入物编码的VH序列。

[0122] E97.分离的抗体或其抗原结合片段,包含由保藏在ATCC并具有ATCC保藏号PTA-124324的质粒的插入物编码的VL序列。

[0123] E98.抗体或其抗原结合片段,其与以下中的一种或多种竞争与人CXCR5的结合:小鼠11G2、嵌合11G2、h11G2 VH(XC152)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC152)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC152)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC152)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC152)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC152)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC152)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC155)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC155)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC155)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC155)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC155)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC155)/VL(XC3484)、h11G2 VH(XC155)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC156)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC156)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC156)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC156)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC156)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC156)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC156)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC157)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC157)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC157)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC157)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC157)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC157)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC157)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC350)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC350)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC350)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC350)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC350)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC350)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC350)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC351)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC351)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC351)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC351)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC351)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC351)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC351)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC352)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC352)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC352)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC352)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC352)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC352)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC352)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC353)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC353)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC353)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC353)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC353)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC353)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC353)/VL(XC349)、h11G2 VH(XC354)/VL(XC151)、h11G2 VH(XC354)/VL(XC153)、h11G2 VH(XC354)/VL(XC154)、h11G2 VH(XC354)/VL(XC346)、h11G2 VH(XC354)/VL(XC347)、h11G2 VH(XC354)/VL(XC348)、h11G2 VH(XC354)/VL(XC349)、小鼠41A10、嵌合41A10、h41A10 VH(XC147)/VL(XC142)、h41A10 VH(XC147)/VL(XC143)、h41A10 VH(XC147)/VL(XC144)、h41A10 VH(XC147)/VL(XC145)、h41A10 VH(XC147)/VL(XC146)、h41A10 VH(XC147)/VL(XC149)、h41A10 VH(XC148)/VL(XC142)、h41A10 VH(XC148)/VL(XC143)、h41A10 VH(XC148)/VL(XC144)、h41A10 VH(XC148)/VL(XC145)、h41A10 VH(XC148)/VL(XC146)、h41A10 VH(XC148)/VL(XC149)、h41A10 VH(XC150)/VL(XC142)、

h41A10 VH(XC150)/VL(XC143)、h41A10 VH(XC150)/VL(XC144)、h41A10 VH(XC150)/VL(XC145)、h41A10 VH(XC150)/VL(XC146)、h41A10 VH(XC150)/VL(XC149)、小鼠5H7和嵌合5H7。

[0124] E99. 抗体或其抗原结合片段, 其与E1-E98中任一项的抗体的CXCL13竞争与具有CXCL13的人CXCR5的结合。

[0125] E100. E1-E99中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或抗原结合片段是Fc融合蛋白、单抗体(monobody)、最大抗体(maxibody)、双功能抗体、scFab、scFv、肽抗体(peptibody)。

[0126] E101. E1-E100的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段结合人CXCR5, KD约等于或小于选自以下的值: 约10nM、5nM、2nM、1nM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、250pM、200pM、150pM、100pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、5pM和1pM。

[0127] E102. E1-E101的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段结合食蟹猴CXCR5, KD约等于或小于选自以下的值: 10nM、5nM、2nM、1nM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、250pM、200pM、150pM、100pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、13pM、10pM、5pM和1pM。

[0128] E103. E1-E102的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段与食蟹猴CXCR5的结合KD在抗体或其抗原结合片段与人CXCR5的结合KD的1个数量级内。

[0129] E104. E1-E103的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或抗原结合片段与人CXCR5的结合KD相比于与食蟹猴CXCR5的结合的比率是5:1至1:5。

[0130] E105. E1-E104的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或抗原结合片段与人CXCR5的结合KD相比于与食蟹猴CXCR5的结合的比率是2:1至1:2。

[0131] E106. E1-E105的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或抗原结合片段与食蟹猴CXCR5的结合KD相比于与人CXCR5的结合的比率在如下范围内: 其下限值选自: 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5和6.2, 并且其上限值选自: 1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、6.2、9、9.2和10。

[0132] E107. E1-E106的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或抗原结合片段与SEQ ID NO: 33的食蟹猴CXCR5的结合KD相比于与SEQ ID NO: 32的人CXCR5的结合的比率是约1.0至约10.0。

[0133] E108. E1-107中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其中在人中的预期半衰期范围是约一(1)天至二十一(21)天。

[0134] E109. E1-108中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其中在人中的预期半衰期是约十七(17)天。

[0135] E110. 抗体或其抗原结合片段, 包含选自以下的抗体或其抗原结合片段的CDR: 小鼠11G2 VH、小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VH、嵌合11G2 VL、人源化的11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2

VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)、h11G2 VH(XC354)、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)、h11G2 VL(XC349)、小鼠41A10 VH、小鼠41A10 VL、嵌合41A10 VH、嵌合41A10 VL、人源化的41A10 VH(XC147)、h41A10 VH(XC148)、h41A10 VH(XC150)、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)、h41A10 VL(XC149)、小鼠5H7 VH、小鼠5H7 VL、嵌合5H7 VH和嵌合5H7 VL。

[0136] E111. 抗体或其抗原结合片段, 包含选自以下的抗体或其抗原结合片段的VL和VH: 小鼠11G2 VH、小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VH、嵌合11G2 VL、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)、h11G2 VH(XC354)、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)、h11G2 VL(XC349)、小鼠41A10 VH、小鼠41A10 VL、嵌合41A10 VH、嵌合41A10 VL、人源化的41A10 VH(XC147)、h41A10 VH(XC148)、h41A10 VH(XC150)、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)、h41A10 VL(XC149)、小鼠5H7 VH、小鼠5H7 VL、嵌合5H7 VH和嵌合5H7 VL。

[0137] E112. 抗体或其抗原结合片段, 选自:

[0138] a. 抗体, 包含小鼠11G2 VH和小鼠11G2 VL;

[0139] b. 抗体, 包含嵌合11G2 VH和嵌合11G2 VL;

[0140] c. 抗体, 包含人源化的11G2 VH(XC152)和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);

[0141] d. 抗体, 包含人源化的11G2 VH(XC155), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);

[0142] e. 抗体, 包含人源化的11G2 VH(XC156), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);

[0143] f. 抗体, 包含人源化的11G2 VH(XC157), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);

[0144] g. 抗体, 包含人源化的11G2 VH(XC350), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);

[0145] h. 抗体, 包含h11G2 VH(XC351), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);

[0146] i. 抗体, 包含h11G2 VH(XC352), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);

- [0147] j. 抗体, 包含h11G2 VH(XC353), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);
- [0148] k. 抗体, 包含h11G2 VH(XC354), 和选自以下的VL: 小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VL、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)和h11G2 VL(XC349);
- [0149] l. 抗体, 包含h11G2 VL(XC151), 和选自以下的VH: 小鼠11G2 VH、嵌合11G2 VH、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)和h11G2 VH(XC354);
- [0150] m. 抗体, 包含h11G2 VL(XC153), 和选自以下的VH: 小鼠11G2 VH、嵌合11G2 VH、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)和h11G2 VH(XC354);
- [0151] n. 抗体, 包含h11G2 VL(XC154), 和选自以下的VH: 小鼠11G2 VH、嵌合11G2 VH、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)和h11G2 VH(XC354);
- [0152] o. 抗体, 包含h11G2 VL(XC346), 和选自以下的VH: 小鼠11G2 VH、嵌合11G2 VH、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)和h11G2 VH(XC354);
- [0153] p. 抗体, 包含h11G2 VL(XC347), 和选自以下的VH: 小鼠11G2 VH、嵌合11G2 VH、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)和h11G2 VH(XC354);
- [0154] q. 抗体, 包含h11G2 VL(XC348), 和选自以下的VH: 小鼠11G2 VH、嵌合11G2 VH、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)和h11G2 VH(XC354);
- [0155] r. 抗体, 包含h11G2 VL(XC349), 和选自以下的VH: 小鼠11G2 VH、嵌合11G2 VH、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)和h11G2 VH(XC354);
- [0156] s. 抗体, 包含小鼠41A10 VH, 和选自以下的VL: 小鼠41A10 VL、嵌合41A10 VL、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)和h41A10 VL(XC149);
- [0157] t. 抗体, 包含嵌合41A10 VH, 和选自以下的VL: 小鼠41A10 VL、嵌合41A10 VL、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)和h41A10 VL(XC149);
- [0158] u. 抗体, 包含人源化的41A10 VH(XC147), 和选自以下的VL: 小鼠41A10 VL、嵌合41A10 VL、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)和h41A10 VL(XC149);
- [0159] v. 抗体, 包含h41A10 VH(XC148), 和选自以下的VL: 小鼠41A10 VL、嵌合41A10 VL、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)和h41A10 VL(XC149);

- [0160] w.h41A10 VH(XC150),和选自以下的VL:小鼠41A10 VL、嵌合41A10 VL、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)、h41A10 VL(XC149)和h41A10 VL(XC142);
- [0161] x.抗体,包含小鼠41A10 VL,和选自以下的VH:小鼠41A10 VH、嵌合41A10 VH、h41A10 VH(XC147)、h41A10 VL(XC148)和h41A10 VH(XC150);
- [0162] y.抗体,包含嵌合41A10 VL,和选自以下的VH:小鼠41A10 VH、嵌合41A10 VH、h41A10 VH(XC147)、h41A10 VL(XC148)和h41A10 VH(XC150);
- [0163] z.抗体,包含h41A10 VL(XC143),和选自以下的VH:小鼠41A10VH、嵌合41A10 VH、h41A10 VH(XC147)、h41A10 VL(XC148)和h41A10 VH(XC150);
- [0164] aa.抗体,包含h41A10 VL(XC144),和选自以下的VH:小鼠41A10 VH、嵌合41A10 VH、h41A10 VH(XC147)、h41A10 VL(XC148)和h41A10 VH(XC150);
- [0165] bb.抗体,包含h41A10 VL(XC145),和选自以下的VH:小鼠41A10 VH、嵌合41A10 VH、h41A10 VH(XC147)、h41A10 VL(XC148)和h41A10 VH(XC150);
- [0166] cc.抗体,包含h41A10 VL(XC146),和选自以下的VH:小鼠41A10 VH、嵌合41A10 VH、h41A10 VH(XC147)、h41A10 VL(XC148)和h41A10 VH(XC150);
- [0167] dd.抗体,包含h41A10 VL(XC149),和选自以下的VH:小鼠41A10 VH、嵌合41A10 VH、h41A10 VH(XC147)、h41A10 VL(XC148)和h41A10 VH(XC150)的VH的抗体;
- [0168] ee.抗体,包含小鼠5H7 VH,和选自以下的VL:小鼠5H7和嵌合5H7 VL;
- [0169] ff.小鼠5H7 VL,和选自以下的VH:小鼠5H7 VH和嵌合5H7 VH;
- [0170] gg.抗体,包含h11G2 VH(XC152)和h11G2 VL(XC151);
- [0171] hh.抗体,包含h11G2 VH(XC155)和h11G2 VL(XC153);
- [0172] ii.抗体,包含h11G2 VH(XC155)和h11G2 VL(XC154);
- [0173] jj.抗体,包含h11G2 VH(XC156)和h11G2 VL(XC153);
- [0174] kk.抗体,包含h11G2 VH(XC157)和h11G2(XC154);
- [0175] ll.抗体,包含小鼠11G2 VH和小鼠11G2 VL;
- [0176] mm.抗体,包含嵌合11G2 HC和嵌合11G2 LC;
- [0177] nn.抗体,包含h11G2 VH(XC152)和h11G2 VL(XC151);
- [0178] oo.抗体,包含h11G2 VH(XC155)和h11G2 VL(XC154);
- [0179] pp.抗体,包含h11G2 VH(XC156)和h11G2 VL(XC153);
- [0180] qq.抗体,包含h11G2 VH(XC157)和h11G2 VL(XC154);
- [0181] rr.抗体,包含小鼠41A10 VH和小鼠41A10 VL;
- [0182] ss.抗体,包含嵌合41A10 HC和嵌合41A10 LC;
- [0183] tt.抗体,包含h41A10 VH(XC147)和h41A10 VL(XC142);
- [0184] uu.抗体,包含h41A10 VH(XC147)和h41A10 VL(XC143);
- [0185] vv.抗体,包含h41A10 VH(XC147)和h41A10 VL(XC144);
- [0186] ww.抗体,包含h41A10 VH(XC147)和h41A10 VL(XC145);
- [0187] xx.抗体,包含h41A10 VH(XC148)和h41A10 VL(XC142);
- [0188] yy.抗体,包含h41A10 VH(XC148)和h41A10 VL(XC143);
- [0189] zz.抗体,包含h41A10 VH(XC148)和h41A10VL(XC144);

- [0190] aaa. 抗体, 包含小鼠5H7 VH和小鼠5H7 VL; 和
- [0191] bbb. 抗体, 包含嵌合5H7 HC和嵌合5H7 LC。
- [0192] E113. 抗体或其抗原结合片段, 选自:
- [0193] (a) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VL;
- [0194] (b) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:7的序列的CDR-H1, 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2, 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H3, 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1, 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2, 和包含SEQ ID NO:4的序列的CDR-L3;
- [0195] (c) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:7的序列的CDR-H1, 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2, 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-H3; 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1, 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2, 和包含SEQ ID NO:4的序列的CDR-L3;
- [0196] (d) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:19的序列的CDR-H1, 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H2, 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H3; 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1, 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L2, 和包含SEQ ID NO:16的序列的CDR-L3;
- [0197] (e) 包含如下的抗体: SEQ ID NO:6的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3, 和SEQ ID NO:1的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3;
- [0198] (f) 包含如下的抗体: 包含其由保藏在ATCC具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物编码的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3, 和由保藏在ATCC具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物编码的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3;
- [0199] (g) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VH (XC152) 和包含选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的氨基酸序列的VL;
- [0200] (h) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH (XC155) 和包含选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的氨基酸序列的VL;
- [0201] (i) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH (XC156) 和包含选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的氨基酸序列的VL;
- [0202] (j) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH (XC157) 和包含选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的氨基酸序列的VL;
- [0203] (k) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VH (XC350) 和包含你选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的氨基酸序列的VL;
- [0204] (l) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VH (XC351) 和含有选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的氨基酸序列的VL;
- [0205] (m) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VH (XC352) 和包含选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的氨基酸序列的VL;
- [0206] (n) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VH (XC353) 和包含选自SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的VL;
- [0207] (o) 包含如下的抗体: 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VH (XC354) 和包含选自

SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的VL;

[0208] (p) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VL (XC151) 和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的氨基酸序列的VH;

[0209] (q) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL (XC153) 和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的氨基酸序列的VH;

[0210] (r) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL (XC154) 和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的氨基酸序列的VH;

[0211] (s) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VL (XC346) 和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的氨基酸序列的VH;

[0212] (t) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL (XC347) 和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的氨基酸序列的VH;

[0213] (u) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VL (XC348) 和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的氨基酸序列的VH;

[0214] (v) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VL (XC349) 和包含选自SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的氨基酸序列的VH;

[0215] (w) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH(m 41A10 VH), 和包含选自SEQ ID NO:13、37、58、59、60、61和62的氨基酸序列的VL;

[0216] (x) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH (XC148), 和包含选自SEQ ID NO:13、37、58、59、60、61和62的氨基酸序列的VL;

[0217] (y) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH (XC147), 和包含选自SEQ ID NO:13、37、58、59、60、61和62的氨基酸序列的VL;

[0218] (z) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VH (XC150), 和包含选自SEQ ID NO:13、37、58、59、60、61和62的氨基酸序列的VL;

[0219] (aa) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VL (小鼠h41A10 VL), 和包含选自SEQ ID NO:17、18、38和63的氨基酸序列的VH;

[0220] (bb) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL (h41A10 XC142 VL), 以及包含选自SEQ ID NO:17、18、38和63的氨基酸序列的VH;

[0221] (cc) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL (h41A10 XC143 VL), 和包含选自SEQ ID NO:17、18、38和63的氨基酸序列的VH;

[0222] (dd) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL (h41A10 XC144 VL), 和包含选自SEQ ID NO:17、18、38和63的氨基酸序列的VH;

[0223] (ee) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL (h41A10 XC145 VL), 和包含选自SEQ ID NO:17、18、38和63的氨基酸序列的VH;

[0224] (ff) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL (h41A10 XC1446 VL), 和包含选自SEQ ID NO:17、18、38和63的氨基酸序列的VH;

[0225] (gg) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL (h41A10 XC149 VL), 和包含选自SEQ ID NO:17、18、38和63的氨基酸序列的VH;

[0226] (hh) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH (小鼠5H7 VH), 和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL;

- [0227] (ii) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VL;
- [0228] (jj) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL;
- [0229] (kk) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL;
- [0230] (ll) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL;
- [0231] (mm) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL;和
- [0232] (nn) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL。
- [0233] E114. 抗体或其抗原结合片段,其与E1-E113中任一项的抗体或其抗原结合片段竞争与人CXCR5的结合。
- [0234] E115. 分离的核酸,编码E1-E114中任一项的抗体或其抗原结合片段。
- [0235] E116. 分离的核酸分子,包含至少一个编码E1-E109中任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。
- [0236] E117. 分离的核酸分子,包含选自SEQ ID NO:95、96、97和98所示的序列的核酸序列。
- [0237] E118. 分离的核酸分子,包含SEQ ID NO:95所示的核酸序列。
- [0238] E119. 分离的核酸分子,包含SEQ ID NO:96所示的核酸序列。
- [0239] E120. 分离的核酸分子,包含SEQ ID NO:95所示的核酸序列,和SEQ ID NO:96所示的核酸序列。
- [0240] E121. 分离的核酸分子,包含SEQ ID NO:97所示的核酸序列。
- [0241] E122. 分离的核酸分子,包含SEQ ID NO:98所示的核酸序列。
- [0242] E123. 分离的核酸分子,包含SEQ ID NO:97所示的核酸序列,和SEQ ID NO:98所示的核酸序列。
- [0243] E124. 分离的核酸分子,包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物的核酸序列。
- [0244] E125. 分离的核酸分子,包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物的核酸序列。
- [0245] E126. 分离的核酸,编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VH、VL或两者,其中所述核酸包含SEQ ID NO:95的核酸序列、SEQ ID NO:107的核酸序列或两者。
- [0246] E127. 分离的核酸,编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的轻链、重链或两者,其中所述核酸包含SEQ ID NO:97的核酸序列、SEQ ID NO:98的核酸序列或两者。
- [0247] E128. 分离的核酸,编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VH,其中所述核酸包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物的核酸序列。
- [0248] E129. 分离的核酸,编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VL,其中所述核酸包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物的核酸序列。

- [0249] E130. 分离的核酸, 编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VL和VH, 其中所述核酸包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物的核酸序列和保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物的核酸序列。
- [0250] E131. 载体, 包含E115-E130中任一项的核酸分子。
- [0251] E132. 宿主细胞, 包含E115-E130中任一项的核酸分子, 或E131的载体。
- [0252] E133. E132的宿主细胞, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。
- [0253] E134. E133的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是CHO细胞、COS细胞、HEK-293细胞、NS0细胞、**PER.C6®**细胞或Sp2.0细胞。
- [0254] E135. E132-134中任一项的宿主细胞, 其中所述宿主细胞缺乏功能性 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)。
- [0255] E136. E132-135中任一项的宿主细胞, 其中所述细胞不表达功能性 α -1,6-岩藻糖基转移酶。
- [0256] E137. E132-136中任一项的宿主细胞, 其中所述细胞缺乏编码功能性酶的FUT8基因。
- [0257] E138. E132-137中任一项的宿主细胞, 其中所述细胞缺乏编码功能性FUT8基因的基因。
- [0258] E139. E132-139中任一项的宿主细胞, 其中所述细胞是**Potelligent®** CHOK1SV细胞或Lec13 CHO细胞。
- [0259] E140. E139的宿主细胞, 其中所述细胞是**Potelligent®** CHOK1SV细胞。
- [0260] E141. 制备抗体或其抗原结合片段的方法, 包括在所述抗体或抗原结合片段由所述宿主细胞表达的条件下培养E1-E114中任一项的宿主细胞。
- [0261] E142. E141的方法, 还包括分离所述抗体或其抗原结合片段。
- [0262] E143. 制备非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括培养包含E115-E130中任一项的核酸分子的宿主细胞, 或E131的载体, 其中所述宿主细胞缺乏功能性的FUT8。
- [0263] E144. E143的方法, 其中宿主细胞是**Potelligent®** CHOK1SV细胞。
- [0264] E145. 分离的抗体或其抗原结合片段, 其是使用E141-E114中任一项的方法产生的。
- [0265] E146. E1-E114中任一项的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的。
- [0266] E147. E146的非岩藻糖基化的抗体或其抗原结合片段, 其中与岩藻糖基化的其他方面相同的抗体或其抗原结合片段相比, 所述非岩藻糖基化的抗体或其抗原结合片段表现出增强的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。
- [0267] E148. E146的非岩藻糖基化抗体或其抗原结合片段, 其中与岩藻糖基化的其他方面相同的抗体或其抗原结合片段相比, 所述非岩藻糖基化抗体或其抗原结合片段表现出约2倍、约5倍、约7倍、约10倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍、约120倍、约130倍、约140倍和约143倍的ADCC。
- [0268] E149. 药物组合物, 包含E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,

和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0269] E150.E149的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的。

[0270] E151.降低CXCR5的活性的方法,包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物。

[0271] E152.治疗炎性疾病的方法,包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149-E150中任一项的药物组合物。

[0272] E153.治疗需要免疫抑制的受试者的方法,包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物。

[0273] E154.治疗自身免疫疾病、病症或病况的方法,包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物。

[0274] E155.减少有此需要的受试者中表达CXCR5的细胞的数量方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物。

[0275] E156.E155的方法,其中细胞在其表面上表达CXCR5。

[0276] E157.E156的方法,其中细胞是B细胞和Tfh样细胞。

[0277] E158.E151-E157中任一项的方法,其中所述受试者是人。

[0278] E159.E151-E158中任一项的方法,包括静脉内施用所述抗体或其抗原结合片段,或药物组合物。

[0279] E160.E151-E158中任一项的方法,包括皮下施用所述抗体或其抗原结合片段,或药物组合物。

[0280] E161.E151-E160中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段,或药物组合物约每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次施用、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次、每月两次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每五个月一次、每六个月一次、每七个月一次、每八个月一次、每九个月一次、每十个月一次、每十一个月一次或每十二个月一次施用。

[0281] E162.减少样品中CXCR5+细胞的数量方法,所述方法包括使所述细胞与E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物接触。

[0282] E163.E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物,其用作药物。

[0283] E164.E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物,其用于降低受试者中CXCR5的活性。

[0284] E165.E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物,其用于治疗需要免疫抑制的受试者。

[0285] E166.E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物,其用于治疗受试者的自身免疫性疾病、病症或病况。

[0286] E167.E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗免疫疾病、病症或病况的药物中的用途。

[0287] E168.E149和E150中任一项的药物组合物在制备用于治疗免疫疾病、病症或病况的药物中的用途。

[0288] E169.治疗医学病况的方法,包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物。

[0289] E170.E169的方法,其中病况选自炎症反应,例如炎症皮肤疾病包括牛皮癣和皮炎(例如特应性皮炎);皮炎;系统性硬皮病和硬化;与炎症肠病(如克罗恩病和溃疡性结肠炎)相关的反应;呼吸窘迫综合征(包括成人呼吸窘迫综合征;ARDS);皮炎;脑膜炎;脑炎;葡萄膜炎;结肠炎;胃炎;肾小球肾炎;例如湿疹、哮喘的过敏性疾病以及其他涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病况;动脉粥样硬化;白细胞粘附不足;类风湿关节炎;系统性红斑狼疮(SLE);糖尿病(例如I型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化症;雷诺综合征;自身免疫性甲状腺炎;过敏性脑脊髓炎;干燥综合征;幼发型糖尿病;与由结核、结节病、多发性肌炎、肉芽肿病和血管炎中常见的细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏有关的免疫应答;韦格纳病;恶性贫血(阿迪森氏病);涉及白细胞渗出的疾病;中枢神经系统(CNS)炎症疾病;多器官损伤综合征;溶血性贫血(包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯阳性贫血);重症肌无力;抗原-抗体复合物介导的疾病;抗肾小球基底膜病;抗磷脂综合征;过敏性鼻炎;格雷夫斯病;兰伯特-伊顿肌无力综合征;天疱疮性大疱;天疱疮;自身免疫多发性内分泌病;白癜风;瑞特氏病;僵人综合征;白塞病;巨细胞动脉炎;免疫复合物肾炎;IgA肾病;IgM多发性神经病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症和自身免疫性溶血性疾病;桥本甲状腺炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性血友病;自身免疫性淋巴组织增生综合征(ALPS);自身免疫性葡萄膜视网膜炎;吉兰-巴雷综合征;肺出血-肾炎综合征;混合性结缔组织病;自身免疫性相关不育;结节性多发性动脉炎;斑秃;特发性粘液水肿;移植物抗宿主病;肌肉营养不良(Duchenne、Becker、强直性、肢带、面肩肱、先天性、眼咽、远端、Emery-Dreifuss),和控制表达CXCR5的癌细胞的增殖,例如胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、T细胞白血病和B细胞白血病。

[0290] E171.使用E1-E114和E145-E148中任一项的抗体或其抗原结合片段,或E149和E150中任一项的药物组合物检测样品、组织或细胞中CXCR5的方法,包括将样品、组织或细胞与抗体接触并检测抗体。

[0291] E172.特异性结合CXCR5的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体是选自以下的至少一种抗体:

[0292] (a) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1;包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2;包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3;包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的CDR-H3;

[0293] (b) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1;包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2;包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3;包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2;和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-H3;

[0294] (c) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1;包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L2;包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L3;包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H1;包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H2;和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H3;

[0295] (d) 包含如下的抗体:包含由保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物编码的氨基酸序列的VL和包含由保藏在ATCC具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物编码的氨基酸序列的VH;

[0296] (e) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH;

[0297] (f) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH;

[0298] (g) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VH;

[0299] (h) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH;

[0300] (i) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH;

[0301] (j) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH;

[0302] (k) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH;

[0303] (l) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HC;

[0304] (m) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HC;

[0305] (n) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HC;

[0306] (o) 包含如下的抗体:包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LC,和包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HC;

[0307] (p) 包含如下的抗体:由SEQ ID NO:95的核酸序列编码的VL,和由SEQ ID NO:96的核酸序列编码的VH;和

[0308] (q) 包含如下的抗体:由SEQ ID NO:97的核酸序列编码的LC,和由SEQ ID NO:98的核酸序列编码的HC。

[0309] E173. 分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合C-X-C趋化因子受体5(CXCR5),其中抗体或其抗原结合片段是选自以下的至少一种抗体:

[0310] (a) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基不是亮氨酸的所述表位;

[0311] (b) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在

氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基是苏氨酸的所述表位;

[0312] (c) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基不是天冬氨酸的所述表位;

[0313] (d) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5表位,但不结合其中所述残基是丙氨酸的所述表位;

[0314] (e) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸和在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5表位,但是不结合其中所述亮氨酸被苏氨酸取代和/或所述天冬氨酸被丙氨酸取代的所述表位;

[0315] (f) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基不是亮氨酸的hCXCR5或其片段;

[0316] (g) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基是苏氨酸的hCXCR5或其片段;

[0317] (h) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基不是天冬氨酸的hCXCR5或其片段;

[0318] (i) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5或其片段,但不结合其中所述残基是丙氨酸的hCXCR5或其片段;和

[0319] (j) 抗体或其抗原结合片段,其结合包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是亮氨酸和在氨基酸残基编号22处是天冬氨酸的hCXCR5或其片段,但是不结合其中所述亮氨酸被苏氨酸取代和/或所述天冬氨酸被丙氨酸取代的hCXCR5或其片段。

[0320] E174. 分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合C-X-C-趋化因子受体5(CXCR5),其中抗体或其抗原结合片段是选自以下的至少一种抗体:

[0321] (a) 抗体或其抗原结合片段,其结合在人B细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约6.60pM,其标准差为约正或负2.33pM;

[0322] (b) 抗体或其抗原结合片段,其结合在人循环滤泡T辅助细胞样细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约5.89pM,其标准差为约正或负1.40pM;

[0323] (c) 抗体或其抗原结合片段,其结合在人滤泡T辅助(Tfh)细胞上表达的hCXCR5,表观亲和力EC50是约10.6pM;

[0324] (d) 抗体或其抗原结合片段,其结合在食蟹猴B细胞上表达的cynoCXCR5,表观亲和力EC50是约1.32pM;

[0325] (e) 抗体或其抗原结合片段,其结合在食蟹猴Tfh样细胞上表达的cynoCXCR5,表观亲和力EC50是约10.5pM;

- [0326] (f) 抗体或其抗原结合片段,其在cAMP报告基因测定法中拮抗CXCR5-CXCL13信号传导,EC50是约961pM;
- [0327] (g) 抗体或其抗原结合片段,其对表达hCXCR5的人B细胞表现出ADCC活性,EC50是约2.01pM,其标准差为约正或负2.28pM;
- [0328] (h) 抗体或其抗原结合片段,其对表达hCXCR5的人Tfh样细胞表现出ADCC活性,EC50是约4.28pM,其标准差为约正或负2.88pM;
- [0329] (i) 抗体或其抗原结合片段,其对表达hCXCR5的人Tfh细胞表现出ADCC活性,EC50是约0.11pM;
- [0330] (j) 抗体或其抗原结合片段,其对表达cynoCXCR5的食蟹猴B细胞表现出ADCC活性,EC50是约15.3pM,其标准差为约正或负11.7pM;
- [0331] (k) 抗体或其抗原结合片段,其结合hCXCR5但未检测到结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7和XCR1;
- [0332] (l) 抗体或其抗原结合片段,其抑制CXCR5与CXCL13的结合;
- [0333] (m) 抗体或其抗原结合片段,其结合CXCR5+人B细胞,表观亲和力EC50小于约26pM,但不结合表达CXCR5小鼠、大鼠或兔直系同源物的细胞;
- [0334] (n) 抗体或其抗原结合片段,其拮抗CXCL13对由毛喉素触发的cAMP释放的抑制作用;
- [0335] (o) 抗体或其抗原结合片段,其触发人供体和食蟹猴PBMC和人供体TMC中表达CXCR5的细胞的ADCC;
- [0336] (p) 抗体或其抗原结合片段,其结合人CXCR5但不结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7或XCR1;
- [0337] (q) 抗体或其抗原结合片段,其耗尽外周血中的B细胞;
- [0338] (r) 抗体或其抗原结合片段,其耗尽外周血中的Tfh样细胞;
- [0339] (s) 抗体或其抗原结合片段,其耗尽脾脏中的真正Tfh细胞;和
- [0340] (t) 抗体或其抗原结合片段,其损害体液免疫记忆应答。
- [0341] E175.E172-E174中任一项的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段表现出以下生物学活性中的至少一种:
- [0342] (a) 结合CXCR5+人B细胞,表观亲和力EC50小于约26pM,但不结合表达CXCR5小鼠、大鼠或兔直系同源物的细胞;
- [0343] (b) 拮抗CXCL13对由毛喉素触发的cAMP释放的抑制作用;
- [0344] (c) 触发人供体和食蟹猴PBMC和人供体TMC中表达CXCR5的细胞的ADCC;
- [0345] (d) 结合人CXCR5但不结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7或XCR1;
- [0346] (e) 耗尽外周血中的B细胞;
- [0347] (f) 耗尽外周血中的Tfh样细胞;
- [0348] (g) 耗尽脾脏中的真正Tfh细胞;或

- [0349] (h) 损害体液免疫记忆应答。
- [0350] E176.E172-E175中任一项的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的。
- [0351] E177.分离的核酸,编码E172-E176中任一项的抗体或其抗原结合片段。
- [0352] E178.分离的核酸,编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VH、VL或两者,其中所述核酸包含:SEQ ID NO:95的核酸序列、SEQ ID NO:96的核酸序列或两者。
- [0353] E179.分离的核酸,编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的重链、轻链或两者,其中所述核酸包含:SEQ ID NO:97的核酸序列、SEQ ID NO:98的核酸序列或两者。
- [0354] E180.分离的核酸,编码特异性结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的VH、VL或两者,其中所述核酸包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物的核酸序列、保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物的核酸序列或两者。
- [0355] E181.载体,包含E177-E180中任一项的核酸。
- [0356] E182.宿主细胞,包含E181的载体。
- [0357] E183.E182的宿主细胞,其中所述宿主细胞是选自CHO细胞、COS细胞、HEK-293细胞、NS0细胞、**PER.C6®**细胞或Sp2.0细胞的哺乳动物细胞。
- [0358] E184.E183的宿主细胞,其中所述细胞缺乏功能性 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)。
- [0359] E185.E184的宿主细胞,其中所述细胞是**Potelligent®**CHOK1SV细胞或Lec13 CHO细胞。
- [0360] E186.制备抗体或其抗原结合片段的方法,包括使E185的**Potelligent®**CHOK1SV细胞处在其中所述抗体或其抗原结合片段由所述宿主细胞表达并被非岩藻糖基化的条件下。
- [0361] E187.E186的方法,还包括分离所述抗体或其抗原结合片段。
- [0362] E188.E186的非岩藻糖基化的抗体或其抗原结合片段,其中与岩藻糖基化的其他方面相同的抗体或其抗原结合片段相比,所述抗体表现出增强的ADCC活性。
- [0363] E189.药物组合物,包含E172-E176和E188中任一项的抗体或其抗原结合片段,和药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0364] E190.E172-E176、E188中任一项的抗体或其抗原结合片段和E189的药物组合物,其用于治疗免疫疾病、病症或病况。
- [0365] E190.E172-E176、E188中任一项的抗体或其抗原结合片段或E189的药物组合物,其用于治疗免疫疾病、病症或病况。
- [0366] E190.在有必要的人受试者中治疗或预防由CXCR5介导的免疫疾病、病症或病况的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的E189的药物组合物,其中所述疾病、病症或病况选自炎性反应,例如炎性皮肤病疾病包括牛皮癣和皮炎(例如特应性皮炎);皮炎;系统性硬皮病和硬化;与炎性肠病(如克罗恩病和溃疡性结肠炎)相关的反应;呼吸窘迫综合征(包括成人呼吸窘迫综合征;ARDS);皮炎;脑膜炎;脑炎;葡萄膜炎;结肠炎;胃炎;肾小球肾炎;例如湿疹、哮喘的过敏性疾病以及其他涉及T细胞浸润和慢性炎性反应的病况;动脉粥样硬化;白细胞粘附不足;类风湿关节炎(RA);系统性红斑狼疮(SLE);糖尿病(例如I型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化症;雷诺综合征;自身免疫性甲状腺炎;过敏性脑脊髓

炎;干燥综合征;幼发型糖尿病;和与由结核、结节病、多发性肌炎、肉芽肿病和血管炎中常见的细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏有关的免疫应答;韦格纳病;恶性贫血(阿迪森氏病);涉及白细胞渗出的疾病;中枢神经系统(CNS)炎性疾病;多器官损伤综合征;溶血性贫血(包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯阳性贫血);重症肌无力;抗原-抗体复合物介导的疾病;抗肾小球基底膜病;抗磷脂综合征;过敏性神经炎;格雷夫斯病;兰伯特-伊顿肌无力综合征;天疱疮性大疱;天疱疮;自身免疫多发性内分泌病;白癜风;瑞特氏病;僵人综合征;白塞病;巨细胞动脉炎;免疫复合物肾炎;IgA肾病;IgM多发性神经病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症和自身免疫性溶血性疾病;桥本甲状腺炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性血友病;自身免疫性淋巴组织增生综合征(ALPS);自身免疫性葡萄膜视网膜炎;吉兰-巴雷综合征;肺出血-肾炎综合征;混合性结缔组织病;自身免疫性相关不育;结节性多发性动脉炎;斑秃;特发性粘液水肿;移植物抗宿主病;肌肉营养不良(Duchenne、Becker、强直性、肢带、面肩肱、先天性、眼咽、远端、Emery-Dreifuss),和控制表达CXCR5的癌细胞的增殖,例如胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、T细胞白血病和B细胞白血病。

[0367] E193.E192的方法,其中所述疾病是SLE或类风湿性关节炎。

[0368] E194.E172-E176或E188中任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗免疫疾病、病症或病况的药物中的用途。

[0369] E195.使用根据E172-E176中任一项的抗体或其抗原结合片段检测样品、组织或细胞中的CXCR5的方法,包括使样品、组织或细胞与抗体接触并检测抗体。

[0370] E196.在有此需要的受试者中降低CXCR5的生物学活性的方法,所述方法包括施用治疗有效量的E172-E176或E188中任一项的抗体或其抗原结合片段,或者E189的药物组合物。

[0371] E197.E196的方法,其中抗体介导至少一种表达CXCR5的细胞的耗尽,所述细胞选自脾脏中的Tfh细胞、外周血中的B细胞和外周血中的Tfh样细胞。

[0372] E198.在有此需要的受试者中抑制体液免疫应答的方法,方法包括施用治疗有效量的E172-E176或E188中任一项的抗体或其抗原结合片段,或者E189的药物组合物。

[0373] E199.E198的方法,其中抗体介导至少一种表达CXCR5的细胞的耗尽,所述细胞选自脾脏中的Tfh细胞、外周血中的B细胞和外周血中的Tfh样细胞。

[0374] 附图的简要说明

[0375] 当结合附图阅读时,将更好地理解前述发明概述以及以下对本发明的详述。为了示例说明本发明,在附图中显示了实施方案。然而,应当理解,本发明不限于所显示的精确布置和手段(instrumentality)。

[0376] 图1是示例说明通常存在于免疫球蛋白重链恒定区中的典型双触角糖型的图。该图根据Edelman等人,1969,Proc.Natl.Acad.Sci.USA63(1):78-85的Eu编号如在Kabat等人,1991描述的,在IgG恒定结构域上氨基酸残基编号297处(Asparagine 297;Asn297)上显示了天冬酰胺连接的(N-连接的)糖型。

[0377] 图2A-2G是描绘典型地存在于免疫球蛋白重链恒定区中的示例性双触角糖型的图。“G0”是指其中不存在末端唾液酸(NeuAc)或Gal的双触角结构,“G1”是指具有一个Gal而没有NeuAc的双触角结构,并且“G2”是指具有两个末端Gal而没有Na1Ac的双触角结构。在每种糖型中,岩藻糖通常存在于哺乳动物细胞例如CHO细胞中产生的抗体中。图2A显示了

G2S2,图2B显示了G2S1,图2C显示了G2,图2D显示了G1,图2E显示了G0,图2F显示了G-1,并且图2G显示了G-2。

[0378] 图3描绘了显示各种单克隆抗体(在x轴上指示)与表达人CXCR5的HEK 293细胞(hCXCR5 293)(较浅的柱)和/或表达食蟹猴CXCR5的HEK 293细胞(cynoCXCR5 293)(较深的柱)结合的柱状图。图3中所示的单克隆抗体从左到右分别是11B9、18C7、21A3、23F1、30C3、31F3、39H4、47D11、51D11、52E7、56A9、56G2、57H5、58C12、59F3、4F1、6E9、12E11、16D10、18G4、19D9、19F8、20G4、26E2、41A10、48A10、13F4、17D5、18H9、23C6、1A11、1D10、1C11、3A1、5H3、6D6、9G11、10G2、12C1、12C3、15A11、15C10、15D5、18A11、19C11、20D10、21B2、21G3、25D4、25E1、5H7、11G2、18B11、23D5、23F7、31E5、19G2和31G7。

[0379] 图4A描绘了显示各种抗CXCR5抗体与表达CXCR1的细胞缺乏可检测结合的图。

[0380] 图4B描绘了显示各种抗CXCR5抗体与表达CXCR2的细胞缺乏结合的图。

[0381] 图4C描绘了显示各种抗CXCR5抗体与表达CXCR3的细胞缺乏结合的图。

[0382] 图4D描绘了显示各种抗CXCR5抗体与天然表达CXCR4的Jurkat细胞的结合的图。

[0383] 图5描绘了显示抗体与表达CXCR5的细胞的结合亲和力的图:非岩藻糖基化的h11G2 XC154/XC155(空心圆)、岩藻糖基化的h11G2XC154/XC155(实心圆)、2C9(实心三角形)、16D7(实心正方形)和11A7(实心椭圆形)。

[0384] 图6显示人和小鼠CXCR5氨基酸序列的比对。该图还显示了CXCR5的各个胞外结构域,标记为“N”、加下划线的“L1”、“L2”和“L3”。

[0385] 图7描绘了显示某些氨基酸残基对于抗体结合hCXCR5是至关重要的柱状图。换言之,改变D10G或将SI插入人序列后,消除了抗体2C9的结合,但不影响其他三种抗体的结合。更重要的是,取代L11T或D22A消除了11G2的结合,但不影响2C9、16D7或11A7的结合。将氨基酸残基编号19处的W改为K(W19K)消除了抗体16D7和11A7的结合,但不影响11G2和2C9的结合。这些数据证明这四种抗体在hCXCR5上不共享相同的表位。

[0386] 图8A描绘了显示雄性食蟹猴中外周血B细胞的耗尽和重建的图。显示了至探索性毒性研究的第352天,每 μ l雄性血液中外周血B细胞的数量。B细胞定义为CD3-CD20⁺。显示了个体动物数据。雄性猴中B细胞的历史范围(每 μ l 272-2503个细胞)用虚线表示。

[0387] 图8B描绘了显示雌性食蟹猴中外周血B细胞的耗尽和重建的图。显示了至探索性毒性研究的第352天,每 μ l雌性血液中外周血B细胞的数量。B细胞定义为CD3-CD20⁺。显示了个体动物数据。雌性猴中B细胞的历史范围(每 μ l 233-1700个细胞)用虚线表示。

[0388] 图8C描绘了显示雄性食蟹猴中Tfh样(也称为“cTfh”或“循环Tfh”细胞)细胞的耗尽和重建的图。显示了至探索性毒性研究的第352天,每 μ l雄性血液中外周血Tfh样细胞的数量。Tfh样细胞被定义为CD3+CD4+CD95+CXCR5⁺细胞和CD3+CD4+CD95+hIgG⁺细胞的总和,因为受试品干扰用于免疫表型分型的CXCR5抗体。显示了个体动物数据。

[0389] 图8D描绘了显示雌性食蟹猴中Tfh样(也称为“cTfh”或“循环Tfh”细胞)细胞的耗尽和重建的图。显示了至探索性毒性研究的第352天,每 μ l雌性血液中外周血Tfh样细胞的数量。Tfh样细胞被定义为CD3+CD4+CD95+CXCR5⁺细胞和CD3+CD4+CD95+hIgG⁺细胞的总和,因为受试品干扰用于免疫表型分型的CXCR5抗体。显示了个体动物数据。

[0390] 图9A描绘了显示食蟹猴中外周血B细胞的耗尽和重建的图。显示了至关键的GLP毒性研究的第393天,每 μ l猴血液中外周血B细胞的数量。B细胞定义为CD3-CD20+HLA-DR+细

胞。显示了组平均数据(雄性和雌性的总和) \pm 标准偏差。

[0391] 图9B描绘了显示食蟹猴中外周血CXCR5+B细胞的耗尽和重建的图。显示了至关键的GLP毒性研究的第393天,每 μ l猴血液中外周血CXCR5+B细胞的数量。B细胞定义为CD3-CD20+HLA-DR+细胞。显示了组平均数据(雄性和雌性的总和) \pm 标准偏差。

[0392] 图9C描绘了显示食蟹猴中外周血循环滤泡T辅助细胞(cTfh;在本文中其他地方也称为“Tfh样细胞”)的耗尽和重建的图。显示了至关键的GLP毒性研究的第393天,每 μ l猴血液中外周血cTfh细胞的数量。cTfh细胞定义为CD3+CD4+CD95+细胞。显示了组平均数据(雄性和雌性的总和) \pm 标准偏差。

[0393] 图9D描绘了显示食蟹猴中具有可检测的表面CXCR5的外周血CXCR5+cTfh细胞(在本文中其他地方也称为“Tfh样细胞”)的耗尽和重建的图。显示了至关键的GLP毒性研究的第393天,每 μ l猴血液中外周血CXCR5+cTfh细胞的数量。cTfh细胞定义为CD3+CD4+CD95+细胞。显示了组平均数据(雄性和雌性的总和) \pm 标准偏差。

[0394] 详述

[0395] 本文公开了特异性结合CXCR5的抗体,并且还公开了拮抗CXCR5活性或其与CXCL13的相互作用的抗体。提供了制备CXCR5抗体的方法,包含这些抗体的组合物以及使用这些抗体的方法。

[0396] 提供了结合CXCR5的岩藻糖基化的和非岩藻糖基化的抗体。在一些实施方案中,还提供了能够形成结合CXCR5的抗体的非岩藻糖基化的抗体重链和轻链。在一些实施方案中,提供了包含一个或多个特定互补决定区(CDR)的非岩藻糖基化的抗体、重链和轻链。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体具有改变的效应子功能。在一些实施方案中,相对于本发明其他方面相同的岩藻糖基化的抗CXCR5抗体,本发明的抗体具有增强的ADCC活性。

[0397] 提供了编码结合CXCR5的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。还提供了编码抗体重链或轻链的多核苷酸。提供了表达岩藻糖基化的和/或非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体的宿主细胞。提供了使用针对CXCR5的非岩藻糖基化的和岩藻糖基化的抗体的治疗方法。这样的方法包括但不限于治疗与CXCR5表达和/或结合CXCL13有关或由其介导的疾病的方法,包括但不限于炎性和免疫性疾病。

[0398] 本文中使用的章节标题仅出于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0399] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请、专利出版物和Genbank登录号均通过引用并入本文,如同每个单独的参考文献均被明确地和单独地指出通过引用全部并入。

[0400] 本领域技术人员通常容易理解并通常使用常规方法来使用本文描述或参考的技术和程序,例如在如下所述的广泛使用的方法,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 3rd.edition(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubel等eds.,(2003));系列METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press,Inc.):PCR 2:A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor eds.(1995)),Harlow和Lane,eds.(1988)ANTIBODIES,A LABORATORY MANUAL和ANIMAL CELL CULTURE(R.I.Freshney,ed.(1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait,ed.,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis,ed.,1998)

Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather和P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths和D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir和C.C. Blackwell, eds); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller和M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等人, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan等人, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley和Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway和P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd和C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow和D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)); The Antibodies (M. Zanetti和J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 和Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita等人, eds., J.B. Lippincott Company, 1993); 及其更新版本。

[0401] CXCR5抗体(无论是岩藻糖基化的还是非岩藻糖基化的)都可以用于预防、治疗和/或缓解由CXCR5活性引起和/或与之相关的疾病、病症或病况。此类疾病、病症或病况包括但不限于炎性反应,例如系统性红斑狼疮(SLE);慢性炎性反应;动脉粥样硬化;白细胞粘附不足;类风湿关节炎;糖尿病(例如I型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化症;雷诺综合征;自身免疫性甲状腺炎;过敏性脑脊髓炎;干燥综合征;幼发型糖尿病;和与由结核、结节病、多发性肌炎、肉芽肿病和血管炎中常见的细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏有关的免疫应答;韦格纳病;恶性贫血(阿迪森氏病);涉及白细胞渗出的疾病;中枢神经系统(CNS)炎性疾病;多器官损伤综合征;溶血性贫血(包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯阳性贫血);重症肌无力;抗原-抗体复合物介导的疾病;抗肾小球基底膜病;抗磷脂综合征;过敏性神经炎;格雷夫斯病;兰伯特-伊顿肌无力综合征;天疱疮性大疱;天疱疮;自身免疫多发性内分泌病;白癜风;瑞特氏病;僵人综合征;白塞病;巨细胞动脉炎;免疫复合物肾炎;IgA肾病;IgM多发性神经病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症和自身免疫性溶血性疾病;桥本甲状腺炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性血友病;自身免疫性淋巴组织增生综合征(ALPS);自身免疫性葡萄膜视网膜炎;吉兰-巴雷综合征;肺出血-肾炎综合征;混合性结缔组织病;自身免疫性相关不育;结节性多发性动脉炎;斑秃;特发性粘液水肿;移植物抗宿主病;肌肉营养不良(Duchenne、Becker、强直性、肢带、面肩肱、先天性、眼咽、远端、Emery-Dreifuss),和控制表达CXCR5的癌细胞的增殖,例如胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、T细胞白血病和B细胞白血病如本领域技术人员根据本文公开的教导所理解的。

[0402] I. 定义

[0403] 通过参考以下对本发明示例性实施方案的详细说明及其中包括的实例,可以更容易地理解本发明。

[0404] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0405] 此外,除非上下文另外要求或明确指出,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。

[0406] 应当理解,本文描述的本发明的方面和实施方案包括“由方面和实施方案组成”和/或“基本上由方面和实施方案组成”。如本文所用,除非另有说明,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数引用。

[0407] 在本申请中,除非本领域技术人员明确说明或理解,否则“或”的使用是指“和/或”。在多个从属权利要求的上下文中,“或”的使用是指多于一个在先独立或从属权利要求。

[0408] 当与可测量的数值变量结合使用时,“大约”或“大致”是指变量的指示值以及该指示值的实验误差内(例如在平均值的95%置信区间)或指示值的10%以内的所有值,以较大者为准。数字范围包括定义范围的数字。

[0409] 尽管阐述本发明的广泛范围的数值范围和参数是近似值,但是在具体示例中阐述的数值被尽可能精确地报告。但是,任何数值都固有地包含某些误差,这些误差必定是由它们各自的测试测量中发现的标准差引起的。此外,本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如提及的范围“1至10”应被视为包括最小值1和最大值10之间(并包括该值)之间的任何和所有子范围;换言之,所有子范围均以最小值1或更大的值开始,例如1到6.1,并且以10或更小的最大值结尾,例如5.5到10。

[0410] 在整个说明书和权利要求书中,单词“包括(comprise)”或变体诸如“含有(comprises)”或“包含(comprising)”将被理解为暗示包括所述整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。除非上下文另有要求,否则单数形式应包括复数,并且复数形式应包括单数。术语“如(e.g.)”或“例如(for example)”之后的任何实例并不意味着穷举或限制。

[0411] 应当理解,无论本文中在何处用语言“包括”描述实施方案,也提供根据“由.....组成”和/或“基本上由.....组成”描述的其他类似实施方案。

[0412] 在根据马库什组或其他替代分组来描述本发明的方面或实施方案的情况下,本发明不仅涵盖作为整体列出的整个组,而且还包括组的单独地每个成员以及主组的所有可能的亚组,以及缺乏一个或多个组成员的主组。本发明还考虑在请求保护的发明中明确排除任何一个或多个组成员。

[0413] 应当理解,本文所使用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的,并不旨在进行限制。在本说明书和所附的权利要求书中,将参考多个术语,这些术语应被定义为具有以下含义。

[0414] 术语“分离的分子”(其中分子是例如多肽、多核苷酸或者抗体或其片段)是这样的分子,由于其起源或衍生来源:(1)没有与在其自然状态下相伴的自然结合的组分结合(2)基本上没有来自同一物种的其他分子(3)由来自不同物种的细胞表达,或者(4)在自然界中不存在。因此,化学合成的分子或在不同于其自然来源的细胞的细胞系统中表达的分子将是与其自然结合的组分“分离”的。使用本领域公知的纯化技术,通过分离也可以使分子基本不含天然结合的组分。分子纯度或均质性可以通过本领域众所周知的多种方法来测定。例如多肽样品的纯度可以使用聚丙烯酰胺凝胶电泳和使用本领域众所周知的技术将凝胶染色以显示多肽来测定。为了某些目的,可以通过使用HPLC或本领域熟知的其他纯化方法来提供更高的分离度。

[0415] 如本文所用,“基本上纯的”是指目标物质是存在的主要物质(即,以摩尔为基础,它比组合物中的任何其他单个物质更丰富),并且优选地,基本上纯化的级分是组合物其中目标物质(例如糖蛋白,包括抗体或受体)占存在的所有大分子物质的至少约50%(以摩尔为基础)。通常,基本上纯的组合物将占组合物中存在的所有大分子物质的大于约80%,更优选地大于约85%、90%、95%和99%。最优选地,将目标物质纯化至基本均质(通过常规检测方法不能在组合物中检测到污染物),其中组合物基本上由单个大分子物质组成。在某些实施方案中,基本上纯的材料是至少50%的纯度(即,没有污染物),更优选地,至少90%的纯度,更优选地,至少95%的纯度,再更优选地,至少98%的纯度,和最优选地,至少99%的纯度。

[0416] 如本领域已知的,术语“同一性”是指两个或更多个多肽分子或者两个或更多个核酸分子的序列之间的关系,如通过比较序列确定的。在本领域中,“同一性”还指多肽或核酸分子序列之间序列相关性的程度,视情况而定,这取决于核苷酸或氨基酸序列的字符串之间的匹配。“同一性”衡量通过计算机程序的特定数学模型(即“算法”)解决的具有缺口比对的两个或更多个序列之间的相同匹配的百分比。

[0417] 术语“相似性”是相关概念,但是与“同一性”不同,是指相似性的量度,其包括相同匹配和保守取代匹配。由于保守取代适用于多肽而不是核酸分子,因此相似性仅涉及多肽序列比较。如果两个多肽序列具有例如20个相同氨基酸中的10个,其余均为非保守取代,则同一性和相似性百分比都是50%。如果在同一实例中,还有5个位置存在保守取代,则同一性百分比仍为50%,但相似性百分比将是75%(20之15)。因此,在存在保守取代的情况下,两个多肽序列之间相似性的程度将高于这两个序列之间的同一性百分数。

[0418] 根据本发明的多肽或抗体的“片段”或“部分”可以通过截短制备,例如通过从多肽的N和/或C末端去除一个或多个氨基酸。以这种方式,可以从N和/或C末端去除多至10个、多至20个、多至30个、多至40个或更多个氨基酸。片段或部分也可以由一个或多个内部缺失产生。

[0419] 变体抗体可以包含从上述特定序列和片段的1、2、3、4、5、多至10、多至20、多至30或更多个氨基酸取代和/或缺失和/或插入。“缺失”变体可以包括单个氨基酸的缺失,一小部分氨基酸例如2、3、4或5个氨基酸的缺失,或较大氨基酸区域的缺失,例如特定氨基酸结构域或其他特征的缺失。“插入”变体可以包括单个氨基酸的插入,一小组氨基酸例如2、3、4或5个氨基酸的插入,或较大氨基酸区域的插入,例如特定氨基酸结构域或其它特征的插入。“取代”变体优选地涉及用相同数目的氨基酸替换一个或多个氨基酸并进行保守的氨基酸取代。例如氨基酸可以被具有相似特性的替代氨基酸取代,例如另一种碱性氨基酸,另一种酸性氨基酸,另一种中性氨基酸,另一种带电氨基酸,另一种亲水性氨基酸,另一种疏水性氨基酸,另一种极性氨基酸,另一种芳族氨基酸或另一种脂族氨基酸。可以用来选择合适的取代基的20种主要氨基酸的一些特性如下。

[0420] 取代变体具有在抗体分子中至少一个氨基酸残基被去除并且在其位置插入不同的残基。取代诱变最感兴趣的位点包括高变区,但也考虑框架改变。保守取代显示在表1中“保守取代”标题下。如果这样的取代导致生物学活性的改变,则可以引入更实质性的改变,如下所示或以下参照氨基酸类别进一步描述的命名为“示例性取代”,并筛选产物。

[0421] 表1

[0422] 氨基酸和取代

原始残基	保守取代	示例性取代
丙氨酸 Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
精氨酸 Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
天冬酰胺 Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
天冬氨酸 Asp (D)	Glu	Glu; Asn
半胱氨酸 Cys (C)	Ser	Ser; Ala
谷氨酰胺 Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
谷氨酸 Glu (E)	Asp	Asp; Gln
甘氨酸 Gly (G)	Ala	Ala
组氨酸 His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
异亮氨酸 Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
亮氨酸 Leu (L)	Ile	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
赖氨酸 Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
甲硫氨酸 Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
苯丙氨酸 Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
脯氨酸 Pro (P)	Ala	Ala

[0423]

原始残基	保守取代	示例性取代
丝氨酸 Ser (S)	Thr	Thr
苏氨酸 Thr (T)	Ser	Ser
色氨酸 Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
酪氨酸 Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
缬氨酸 Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0424]

[0425] 通过选择在其对维持以下的作用上有显著不同的取代来完成抗体生物学性质的实质性修饰：(a) 取代区域中的多肽主链结构，例如为 β -折叠或螺旋构象，(b) 分子在靶标位点的电荷或疏水性，或(c) 侧链的大体积。自然存在的残基根据常见的侧链特性分为几类：

[0426] i. 非极性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0427] ii. 极性无电荷：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0428] iii. 酸性（带负电荷）：Asp、Glu；

[0429] iv. 碱性（带正电荷）：Lys、Arg；

[0430] v. 影响链取向的残基：Gly、Pro；和

[0431] vi. 芳香族：Trp、Tyr、Phe、His。

[0432] 通过将这类别之一的成员交换为另一类别来进行非保守取代。

[0433] 例如可以进行的一种取代类型是将抗体中的一个或多个半胱氨酸（其是具有化学反应性的）改变为对另一残基例如但不限于丙氨酸或丝氨酸。例如可以存在非典型半胱氨酸的取代。可以在抗体的可变结构域或恒定区的CDR或框架区中进行取代。在一些实施方案

中,半胱氨酸是典型的。通常也可以用丝氨酸取代不参与维持抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基,以改善分子的氧化稳定性并防止异常的交联。相反,可将半胱氨酸键添加至抗体以改善其稳定性,特别是当抗体是抗体片段如Fv片段时。

[0434] “抗体”是能够通过位于免疫球蛋白分子可变区中的至少一个抗原识别位点特异性结合靶标,例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等的免疫球蛋白分子。如本文所用,该术语不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体,而且除非另有说明,否则包括与完整抗体竞争特异性结合的任何抗原结合片段、包含抗原结合片段的融合蛋白以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型。抗原结合片段包括,例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、结构域抗体(dAb,例如鲨鱼和骆驼科抗体)、包括互补决定区(CDR)的片段、单链可变体片段抗体(scFv)、最大抗体、迷你抗体、体内抗体(intrabody)、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双-scFv,以及至少包含足以赋予特定抗原与多肽结合的免疫球蛋白的片段的多肽。抗体包括任何类别的抗体,例如IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且抗体不必是任何特定类别。根据其重链恒定区的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同类别。免疫球蛋白有五种主要类别: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0435] 如本文可互换使用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(或简称为“抗体部分”)是指抗体的一个或多个片段,其保留了特异性结合抗原(例如CXCR5)的能力。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来执行。抗体的术语“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括:(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,是包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,(1989) Nature 341:544-546);和(vi) 分离的互补决定区(CDR)、二硫键连接的Fv(dsFv)和抗独特型(抗-Id)抗体和体内抗体。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由不同的基因编码,但是它们可以使用重组方法通过合成的接头连接起来,从而使它们成为单个蛋白链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv));参见例如Bird等人,Science 242:423-426(1988)和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988)。这样的单链抗体也意图包含在抗体的术语“抗原结合片段”内。也包括其他形式的单链抗体,例如双抗体。双抗体是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用的接头太短,无法在同一条链上的两个结构域之间配对,从而迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点(参见例如Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993);Poljak等人,1994,Structure 2: 1121-1123)。

[0436] 抗体可衍生自任何哺乳动物,包括但不限于人、猴、猪、马、兔、狗、猫、小鼠等、或其他动物,例如鸟(例如鸡)、鱼(例如鲨鱼)和骆驼科动物(例如美洲驼)。

[0437] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区(VL)或抗体重链的可变区(VH)。如本领域中已知的,重链和轻链的可变区各自由四个框架区(FR)组成,通过三个“互补决定区(CDR)”连接,互补决定区也称为高变区(HVR),并有助于形成抗体的抗原结合位点。如果需要对象可变区的变体,特别是在CDR区以外(即在框架区中)的氨基酸残基中进行

取代,则可以通过比较对象可变区与其他抗体的可变区(其包含在与对象可变区相同典型分类中的CDR1和CDR2序列)来鉴定合适的氨基酸取代,优选保守氨基酸取代(Chothia和Lesk, *J.Mol.Biol.* 196(4):901-917,1987)。

[0438] 在某些实施方案中,通过解析抗体的结构和/或解析抗体-配体复合物的结构来完成CDR的明确描述和鉴定包含抗体结合位点的残基。在某些实施方案中,这可以通过本领域技术人员已知的各种技术中的任何一种来完成,例如X射线晶体学。在某些实施方案中,可以采用各种分析方法来鉴定或估计CDR区。在某些实施方案中,可以采用各种分析方法来鉴定或估计CDR区。此类方法的实例包括但不限于Kabat定义、Chothia定义、AbM定义、接触定义和构象定义。

[0439] Kabat定义是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定CDR区。参见例如Johnson&Wu,2000,*Nucleic Acids Res.*,28:214-8。Chothia定义类似于Kabat定义,但Chothia定义考虑了某些结构环区域的位置。参见例如Chothia等人,1986,*J.Mol.Biol.*,196:901-17;Chothia等人,1989,*Nature*,342:877-83。AbM定义使用由Oxford Molecular Group生产的用于对抗体结构建模的计算机程序的集成套件。参见例如Martin等人,1989,*Proc Natl Acad Sci (USA)*,86:9268-9272;“AbM™,A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,”Oxford,UK;Oxford Molecular,Ltd。AbM定义使用知识数据库和从头算方法的组合,从一级序列中模拟抗体的三级结构,例如Samudrala等人,1999,“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach,”在PROTEINS,Structure,Function and Genetics Suppl.,3:194-198中描述的那些。

[0440] 接触定义基于对可用的复杂晶体结构的分析。参见例如MacCallum等人,1996,*J.Mol.Biol.*5:732-45。在本文称为CDR的“构象定义”的另一种方法中,可以将CDR的位置鉴定为对抗原结合起焓作用的残基。参见例如Makabe等人,2008,*Journal of Biological Chemistry*,283:1156-1166。还有其他CDR边界定义可能并不严格遵循上述方法之一,但仍会与Kabat CDR的至少一部分重叠,但是可以根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验发现来缩短或延长它们。如本文所用,CDR可指通过本领域已知的任何方法定义的CDR,包括方法的组合。本文使用的方法可以利用根据这些方法中的任何一种定义的CDR。对于包含一个以上CDR的任何给定实施方案,可以根据Kabat、Chothia、延伸、AbM、接触和/或构象定义中的任一个来定义CDR。

[0441] 如本文所用,关于抗体或与其特异性结合的抗原的“接触残基”是指存在于抗体/抗原中的氨基酸残基,其包含至少一个的重原子(即,非氢)在同源抗体/抗原上存在的氨基酸残基的重原子的4 Å或更少以内。

[0442] “框架”(FR)残基是除CDR残基之外的抗体可变域残基。VH或VL结构域框架包含四个框架子区域FR1、FR2、FR3和FR4,间隔CDR,以以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0443] 如本文先前所述,可变结构域中的残基通常根据Kabat编号,Kabat是用于抗体编写的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。参见Kabat等人,1991,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可用包含

更少或额外的氨基酸,对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。例如重链可变结构域可以在H2的残基52之后包括单个氨基酸插入物(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后的插入的残基(例如根据Kabat的残基82a、82b和82c)。可以通过在抗体的序列的同源性区域与“标准”Kabat编号的序列进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。有各种用于分配Kabat编号的算法。Abysis (www.abysis.org) 2.3.3版中实现的算法可用于将Kabat编号分配给可变区CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H2和CDR-H3,然后可以将AbM定义用于CDR-H1。

[0444] 如本文所用,“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体群体中获得的抗体,换言之,除了可能以少量存在的可能自然存在的突变以外,构成该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体针对单个抗原位点具有高度特异性。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆的”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不应解释为要求通过任何特定方法来产生抗体。例如根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由Kohler和Milstein, 1975, *Nature* 256:495首先描述的杂交瘤方法来制备,或者可以通过重组DNA方法例如美国专利号4,816,567中所述来制备。单克隆抗体也可以从使用例如McCafferty等人, 1990, *Nature* 348:552-554中描述的技术产生的噬菌体文库中分离。如本文所用,“人源化的”抗体是指非人(例如鼠)抗体的形式,其是含有衍生自非人免疫球蛋白的最少序列的抗体的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合子序列)。优选地,人源化的抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的CDR的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基所取代。人源化抗体可以包含在受体抗体或导入的CDR或框架序列中均未发现的残基,但被包括在内以进一步完善和优化抗体性能。

[0445] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以是亲和力成熟的。例如亲和力成熟的抗体可以通过本领域已知的程序产生(Marks等人, 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783; Barbas等人, 1994, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813; Schier等人, 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton等人, 1995, *J. Immunol.*, 155:1994-2004; Jackson等人, 1995, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9; Hawkins等人, 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896; 和W02004/058184)。

[0446] “人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列和/或已经使用本文公开的任何用于制备人抗体的技术制备的氨基酸序列的抗体。人抗体的该定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化的抗体。

[0447] 术语“嵌合抗体”意指其中可变区序列衍生自一个物种而恒定区序列衍生自另一物种的抗体(例如其中可变区序列衍生自小鼠抗体而恒定区序列衍生自人抗体或反之亦然)的抗体。该术语还涵盖这样的抗体,其包含来自一个物种的一个个体(例如第一只小鼠)的V区和来自相同物种的另一个个体(例如第二只小鼠)的恒定区。

[0448] 术语“抗原(Ag)”是指用于免疫免疫活性脊椎动物以产生识别Ag的抗体(Ab)或筛选表达文库(例如噬菌体、酵母或核糖体展示文库等等)的分子实体。在本文中,Ag被更广泛地称呼,并且通常旨在包括被Ab特异性识别的靶分子,因此包括在用于产生Ab的免疫过程或用于选择Ab的文库筛选中使用的分子的片段或模拟物。因此,对于与CXCR5结合的本发明的抗体,来自哺乳动物物种(例如人、猴、鼠和大鼠CXCR5)的全长CXCR5,包括单体和多聚体,

例如其二聚体、三聚体等,以及CXCR5的被截短的和和其他变体称为抗原。

[0449] 通常,术语“表位”是指抗体特异性结合的抗原(例如蛋白质、核酸、碳水化合物或脂质等)的范围或区域,即与抗体发生物理接触的范围或区域。因此,术语“表位”是指能够在一个或多个抗体的抗原结合区被抗体识别并结合的分子的那部分。通常,在“抗体或其抗原结合片段”(Ab)与其对应抗原之间的分子相互作用的背景下定义表位。表位通常由诸如氨基酸或糖侧链之类的分子的表面基团组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。在一些实施方案中,表位可以是蛋白质表位。蛋白质表位可以是线性或构象的。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点均沿蛋白质的一级氨基酸序列线性发生。“非线性表位”或“构象表位”包括抗原蛋白内的非连续多肽(或氨基酸),对表位具有特异性的抗体与之结合。如本文所用的术语“抗原性表位”定义为抗体可以特异性结合的抗原的一部分,如通过本领域众所周知的任何方法(例如通过常规免疫测定法)所确定的。或者,在发现过程中,抗体的产生和表征可阐明有关所需表位的信息。从该信息,然后可以针对结合相同的表位来竞争性地筛选抗体。实现此目的的一种方法是进行竞争和交叉竞争研究,以发现彼此竞争或交叉竞争与CXCR5的结合的抗体,例如竞争与抗原的结合的抗体。

[0450] 与表位“优先结合”或“特异性结合”(在本文中可互换使用)的抗体是本领域众所周知的术语,并且确定这种特异性或优先结合的方法也是本领域众所周知的。如果与其他细胞或物质相比,分子更频繁地、更快速地、更长久地和/或更大亲和力地与特定细胞或物质发生反应或缔合,则认为该分子表现出“特异性结合”或“优先结合”。如果比其结合其他物质,抗体以更大亲和力、亲合力、更容易地和/或更长久地结合,则抗体“特异性结合”或“优先结合”至靶标。另外,如果比其结合样品中存在的其他物质,抗体以更大亲和力、亲合力、更容易地和/或更长久地结合样品中的靶标,则抗体“特异性结合”或“优先结合”至靶标。例如特异性或优先结合一个CXCR5表位的抗体是与其结合其他CXCR5表位或非CXCR5表位的抗体相比,以更大亲和力、亲合力、更容易地和/或更长久地结合该表位的抗体。通过阅读该定义也可以理解,例如特异性地或优先地结合第一靶标的抗体(或部分或表位)可以或不特异性地或优先地结合第二靶标。这样,“特异性结合”或“优先结合”并不一定需要(尽管可以包括)排他结合。通常,但并非必须,提及结合是指优先结合。“特异性结合”或“优先结合”包括识别并结合特定分子但基本上不识别或结合样品中其他分子的化合物,例如蛋白质、核酸、抗体等。例如识别并结合样品中的同源配体或结合伴侣(例如结合CXCR5的抗CXCR5抗体)但基本上不识别或结合样品中其他分子的抗体或肽受体特异性地结合该同源配体或结合伴侣。因此,在指定的测定法条件下,指定的结合部分(例如抗体或其抗原结合片段或者受体或其配体结合片段)优先结合特定靶分子而与测试样品中存在的其他组分不大量结合。

[0451] 各种测定法形式可以用于选择特异性结合目的分子的抗体或肽。例如固相ELISA免疫测定法、免疫沉淀、Biacore™(GE Healthcare,Piscataway,NJ)、KinExA、荧光激活细胞分选(FACS)、Octet™(FortéBio,Inc.,Menlo Park,CA)和蛋白质印迹分析是可以用于鉴定与抗原或受体特异性反应的抗体,或者与同源配体或结合伴侣特异性结合的其配体结合片段的许多测定法中的一些。通常,特异性或选择性反应将至少是背景信号或噪声的两倍,更通常是背景的大于10倍,甚至更通常是背景的大于50倍,更通常是背景的大于100倍以上,

甚至更通常是背景的大于500倍,甚至更通常是背景的大于1000倍,并且甚至更通常是背景的大于10,000倍。备选地,当平衡解离常数(K_D) $\leq 1\mu\text{M}$,优选地 $\leq 100\text{nM}$,更优选地 $\leq 10\text{nM}$,甚至更优选地 $\leq 100\text{pM}$,再更优选地 $\leq 10\text{pM}$,并且甚至更优选地 $\leq 1\text{pM}$ 时,则称抗体“特异性结合”抗原。在一些实施方案中,当平衡解离常数(K_D) $\leq 7\text{nM}$ 时,称抗体“特异性结合”抗原。

[0452] 术语“结合亲和力”在本文中用作度量两个分子例如抗体或其片段与抗原之间的非共价相互作用的强度。术语“结合亲和力”用于描述单价相互作用(内在活性)。

[0453] 另外,为了确定CXCR5抗体与表达CXCR5的细胞的结合亲和力,可以进行细胞结合实验以确定表观亲和力。抗体与表达靶标的细胞结合的表观亲和力可以通过平衡结合滴定曲线的 EC_{50} 来计算,其中通过流式细胞术对抗原结合群体的几何平均荧光强度(gMFI)进行定量。

[0454] 两个分子例如抗体或其片段和抗原之间通过单价相互作用的结合亲和力,可以通过确定解离常数(K_D)来定量。继而,可以通过使用例如表面等离子共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 K_D 。对应于单价络合物的缔合和解离的速率常数分别称为缔合速率常数 k_a (或 k_{on})和解离速率常数 k_d (或 k_{off})。 K_D 通过等式 $K_D = k_d/k_a$ 与 k_a 和 k_d 相关。解离常数的值可以直接通过众所周知的方法来确定,并且甚至对于复杂的混合物也可以通过诸如Caceci等人(1984,Byte 9:340-362)中所述的方法来计算。例如可以使用双过滤硝化纤维素滤膜结合测定法来建立 K_D ,例如Wong&Lohman(1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5428-5432)公开的测定法。评估配体例如抗体对靶抗原的结合能力的其他标准测定法是本领域已知的,包括例如ELISA、蛋白质印迹、RIA和流式细胞术分析,以及本文其他各处示例的其他测定法。抗体的结合动力学和结合亲和力也可以通过本领域已知的标准测定法来评估,例如表面等离子共振(SPR),例如通过使用Biacore™系统或KinExA。

[0455] 可以进行竞争性结合测定法,其中将抗体与抗原的结合与靶标的另一配体(例如另外结合靶标的另一种抗体或可溶性受体)与靶标的结合进行比较。发生50%抑制的浓度称为 K_i 。在理想条件下, K_i 等价于 K_D 。 K_i 值永远不会小于 K_D ,因此可以方便地替换 K_i 的测量值来提供 K_D 的上限。

[0456] 遵循以上定义,可以通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力,例如比较不同抗体对给定抗原的结合亲和力。抗体或其他结合伴侣的 K_D 值可以使用本领域众所周知的方法确定。确定 K_D 的一种方法是使用表面等离子共振,通常使用生物传感器系统例如**Biacore®**系统。

[0457] 类似地,可以通过确定和比较目的相互作用例如抗体和抗原之间的特异性相互作用的 K_D 值和非目的相互作用例如已知不结合CXCR5的对照抗体的 K_D 值,来评估相互作用的特异性。

[0458] 特异性结合其靶标的抗体可以以高亲和力结合其靶标,换言之,如上所述表现出低 K_D ,并且可以以较低亲和力结合其他非靶标分子。例如抗体可以以 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 或更高,更优选地 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 或更高,更优选地 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 或更高,更优选地 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 或更高,甚至更优选地 $1 \times 10^{-2}\text{M}$ 或更高的 K_D 结合非靶分子。本发明的抗体优选地能够以是其与另一个非CXCR5分子结合的亲和力的至少2倍、10倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍或10,000倍的亲和力结合其靶标。

[0459] 如本文所用的关于抗体的术语“竞争”是指第一抗体或其抗原结合片段以与第二抗体或其抗原结合片段的结合足够相似的方式结合表位,使得与不存在第二抗体的情况下第一抗体的结合相比,在存在第二抗体的情况下第一抗体与其同源表位的结合结果被可检测地降低。在存在第一抗体的情况下第二抗体与其表位的结合也被可检测地降低的替代方案可以但不是必须的。换言之,第一抗体可以抑制第二抗体与其表位的结合,而第二抗体不抑制第一抗体与其各自的表位的结合。但是,在每种抗体可检测地抑制另一种抗体与其同源表位或配体结合的情况下,无论程度相同、更大或更小,这些抗体称为相互“交叉竞争”结合其各自的表位。本发明涵盖竞争性抗体和交叉竞争性抗体。不管发生这种竞争或交叉竞争的机制(例如空间位阻、构象变化或与共同表位或其部分的结合),基于本文提供的教导,本领域技术人员应理解这种竞争和/或交叉竞争抗体被涵盖并且可用于本文公开的方法。

[0460] 标准竞争测定法可用于确定两种抗体是否彼此竞争。一种用于抗体竞争的合适测定法包括使用Biacore技术,该技术可以使用表面等离子共振(SPR)技术(通常使用生物传感器系统(例如 **BIACORE®**系统))来测量相互作用的程度。例如可以在体外竞争性结合抑制测定法中使用SPR,以确定一种抗体抑制第二种抗体结合的能力。用于测量抗体竞争的另一种测定法是使用基于ELISA的方法。

[0461] 此外,在国际专利申请号W02003/48731中描述了基于抗体竞争来“分组(bin)ing)”抗体的高通量方法。如果一种抗体(或片段)减少了另一种抗体(或片段)与CXCR5的结合,则存在竞争。例如可以使用顺序结合竞争测定法,并依次添加不同的抗体。可以添加第一抗体以达到接近饱和的结合。然后,添加第二抗体。如果与不存在第一抗体(其值可设置为100%)的平行测定法相比,未检测到第二抗体与CXCR5的结合或显著降低(例如至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%降低),认为两种抗体是相互竞争的。

[0462] 此外,在实施例8中提供了使用人和小鼠CXCR5蛋白之间的结构域交换来评估几种抗体中潜在表位的示例性抗体表位分组测定法。本领域技术人员应理解,根据本文提供的教导,存在本领域已知的广泛多种测定法可用于确定至少两种抗体相对于彼此的与靶标的结合,并且本文包括此类测定法。

[0463] 可以使用本领域众所周知的方法表征CXCR5抗体。例如一种方法是鉴定其结合的表位或“表位作图”。如上所述,本领域中有许多方法可用于定位和表征蛋白质上表位的位置,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争测定法、基因片段表达测定法和基于合成肽的测定法,例如在Harlow和Lane,Using Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1999的第11章中所述的。在另一个示例中,表位作图可以用来确定CXCR5抗体结合的序列。表位作图可以从各种来源商购获得,例如Pepscan Systems(Edelhertweg 15,8219PH Lelystad,The Netherlands)。表位可以是线性表位,即包含在单个氨基酸片段中,或者可以是不一定包含在单个片段中的氨基酸的三维相互作用形成的构象性表位。可以分离或合成(例如重组)不同长度(例如至少4-6个氨基酸长)的肽,并将其用于采用CXCR5抗体的结合测定法。

[0464] 此外,可以通过使用源自CXCR5序列的重叠肽并确定被抗体结合来在系统筛选中确定CXCR5抗体所结合的表位。根据基因片段表达测定法,编码CXCR5的开放阅读框可以随机地或通过特定的遗传构建进行片段化,并且确定CXCR5所表达的片段与待测抗体的反应

性。基因片段可以例如通过PCR产生,然后在放射性氨基酸存在下在体外转录并翻译成蛋白质。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳确定抗体与放射性标记的CXCR5片段的结合。

[0465] 某些表位还可以通过使用在噬菌体颗粒(噬菌体文库)或酵母(酵母展示)的表面上展示的大型随机肽序列文库来鉴定。备选地,可以在简单的结合测定法中测试定义的重叠肽片段文库与测试抗体的结合。在另一个实例中,可以进行抗原诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变,以鉴定表位结合所需、足够和/或必需的残基。例如可以使用突变体CXCR5进行丙氨酸扫描诱变实验,其中CXCR5多肽的各种残基已经被丙氨酸代替。通过评估抗体与突变体CXCR5的结合,可以评估特定CXCR5残基对抗体结合的重要性。

[0466] 可以用于表征CXCR5抗体的另一种方法是与已知结合相同抗原(即,CXCR5上的各种片段)的其他抗体一起使用竞争测定法,以确定CXCR5抗体是否与其他抗体结合相同的表位。竞争测定法是本领域技术人员众所周知的。

[0467] 此外,可以使用各种实验和计算表位作图方法以不同的详细水平定义和表征给定抗体/抗原结合对的表位。实验方法包括诱变、X射线晶体学、核磁共振(NMR)光谱法、氢/氘交换质谱法(H/D-MS)和本领域公知的各种竞争结合方法。由于每种方法都依赖独特的原理,因此表位的描述与确定表位的方法密切相关。因此,将根据所采用的表位作图方法不同地定义给定抗体/抗原对的表位。

[0468] 在其最详细的水平上,可以通过定义Ag-Ab相互作用中存在的原子接触的空间坐标以及有关它们对结合热力学的相对贡献的信息来定义Ag和Ab之间相互作用的表位。在不太详细的水平上,可以通过限定Ag和Ab之间的原子接触的空间坐标来表征表位。在更不详细的水平上,可以通过在于其所包含的氨基酸残基,如通过特定标准所定义的,例如通过Ab和Ag中的原子(例如重原子,即非氢原子)之间的距离来表征表位。在更不详细的水平上,可以通过功能,例如通过与其他Ab的竞争结合来表征表位。表位也可以更一般地定义为包含氨基酸残基,其被另一个氨基酸取代将改变Ab和Ag之间的相互作用的特征(例如使用丙氨酸扫描)。

[0469] 基于以下事实:取决于所使用的表位作图方法的表位的描述和定义是在不同的详细程度下获得的,因此得出的结论是,可以以不同的详细水平类似地进行相同Ag上不同Ab的表位的比较。

[0470] 以氨基酸水平描述的表位,例如由X-射线结构确定的,如果它们包含相同的氨基酸残基组,则被认为是相同的。如果表位共享至少一个氨基酸,则认为表位重叠。如果表位不共享氨基酸残基,则认为表位是分开的(独特的)。

[0471] 如果相应抗体的结合是互斥的,则认为以竞争结合为特征的表位是重叠的,即一种抗体的结合排除了另一种抗体的同时或连续结合。如果抗原能够同时容纳两种相应抗体的结合,则认为表位是分开的(独特的)。

[0472] 术语“互补位”的定义是通过扭转透视而从上述“表位”的定义中得出的。因此,术语“互补位”是指抗体上特异性结合抗原的范围或区域,即抗体上使得与抗原(CXCR5)接触的氨基酸残基,“接触”在本文其他地方定义。

[0473] 给定抗体/抗原对的表位和互补位可以通过常规方法鉴定。例如可以通过评估抗体结合不同片段或变体CXCR5多肽的能力来确定表位的一般位置。也可以使用常规方法来确定CXCR5内使得与抗体(表位)接触的特定氨基酸和抗体中使得与CXCR5接触的特定氨基

酸(互补位),例如在实施例中描述的方法。例如可以将抗体和靶分子组合并且可以使抗体/抗原复合物结晶。可以确定复合物的晶体结构,并将其用于鉴定抗体与其靶标之间相互作用的特定位点。

[0474] 根据本发明的抗体可以结合与本文具体公开的本发明的抗体相同的CXCR5的表位或结构域。可以用于这种鉴定的目的的分析测定法包括在实施例1-10中所述的生物活性测定法中以及在抗体的晶体结构分析中评估目的抗体和CXCR5受体之间竞争结合CXCR5的测定法。

[0475] 如本文所述,本发明的抗体可以具有与本发明的另一种抗体竞争或交叉竞争结合CXCR5的能力。例如本发明的抗体可以与本文所述的抗体竞争或交叉竞争结合本文公开的抗体所结合的CXCR5,或结合CXCR5的合适片段或变体。

[0476] 换言之,如果第一抗体与第二抗体竞争结合CXCR5,但是在第二抗体首先结合CXCR5的地方不竞争,则认为它与第二抗体“竞争”(也称为单向竞争)。如果一种抗体与另一种抗体竞争,而无论哪种抗体首先结合CXCR5,那么该抗体与另一种抗体“交叉竞争”结合CXCR5。可以基于它们在标准结合测定法中与本发明的已知抗体竞争/交叉竞争的能力来鉴定此类竞争或交叉竞争的抗体。例如SPR例如通过使用Biacore™系统、ELISA测定法或流式细胞术来证明竞争/交叉竞争。这种竞争/交叉竞争可以表明两种抗体结合相同的、重叠的或相似的表位。

[0477] 因此,本发明的抗体可以通过包括结合测定法的方法来鉴定,所述结合测定法评估测试抗体是否能够与参考抗体竞争/交叉竞争靶分子上的结合位点。进行竞争性结合测定法的方法在本文中公开和/或在本领域中是众所周知的。例如它们可以涉及使用抗体可以结合靶分子的条件将本发明的参考抗体与靶分子结合。然后将抗体/靶复合物暴露于测试/第二抗体,并且可以评估测试抗体能够从抗体/靶复合物中置换本发明的参考抗体的程度。备选的方法可以包括在允许抗体结合的条件下使测试抗体与靶分子接触,然后加入能够结合该靶分子的本发明的参考抗体,并评估本发明的参考抗体能够将测试抗体从抗体/靶标复合物中置换或同时结合靶标(即非竞争性抗体)的程度。

[0478] 测试抗体抑制本发明的参考抗体与靶标结合的能力证明测试抗体可以与本发明的参考抗体竞争结合靶标,因此测试抗体结合CXCR5蛋白上的与本发明参考抗体相同或基本相同的表位或区域。在这种方法中被鉴定为与本发明的参考抗体竞争的测试抗体也是本发明的抗体。测试抗体可以在与本发明的参考抗体相同的区域中结合CXCR5并且可以与本发明的参考抗体竞争的事实表明测试抗体可以在与本发明的抗体相同的结合位点处充当配体并且测试抗体因此可以模拟参考抗体的作用,并因此是本发明的抗体。这可以通过使用本文中其他地方更全面描述的测定法,在其他相同的条件下,将测试抗体存在下的CXCR5活性与参考抗体存在下的CXCR5活性进行比较来证实。

[0479] 本发明的参考抗体可以是本文所述的抗体,例如11G2、41A10、5H7和其任何变体或部分,如本文所述的保留与结合CXCR5的能力。本发明的抗体可以结合与本文所述的参考抗体相同的表位或者其任何变体或部分,如本文所述的保留结合CXCR5的能力。

[0480] 如本文之前其他地方所述,可以参考抗体与非靶标分子的结合来评估特异性结合。可以通过比较抗体结合靶标和结合另一分子的能力来进行这种比较。该比较可以如上所述在评估 K_D 或 K_I 中进行。在这种比较中使用的其他分子可以是非靶分子的任何分子。优选

地,另一分子与靶分子不相同。优选地,靶分子不是靶分子的片段。

[0481] 用于确定特异性结合的另一分子可以在结构或功能上与靶标无关。例如另一分子可以是环境中无关的材料或伴随的材料。

[0482] 用于确定特异性结合的另一分子可以是与靶分子即CXCR5参与相同体内途径的另一种分子。通过确保本发明的抗体对CXCR5相对于另一种此类分子具有特异性,可以避免不需要的体内交叉反应性。

[0483] 本发明的抗体可以保留结合一些与靶分子有关的分子的能力。

[0484] 备选地,本发明的抗体可以对特定靶分子具有特异性。例如它可以结合本文所述的一种靶分子,但可以不结合或可能以显著降低的亲和力结合本文所述的不同靶分子。例如全长成熟的人CXCR5可以用作靶标,但是与该靶标结合的抗体可能无法结合或可能以较小的亲和力结合至例如其他物种的其他CXCR5蛋白,例如其他哺乳动物的CXCR5。在一些实施方案中,抗体结合人和小鼠的CXCR5。

[0485] “Fc融合”蛋白是其中一个或多个多肽可操作地连接至Fc多肽的蛋白。Fc融合体将免疫球蛋白的Fc区与融合伴侣组合在一起。

[0486] “天然序列Fc区”包含与自然中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。“变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列Fc区,但保留了天然序列Fc区的至少一种效应子功能的氨基酸序列。优选地,与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中约1至约10个氨基酸取代,优选地约1至约5个氨基酸取代。本文的变体Fc区将优选地与天然序列Fc区和/或亲本多肽的Fc区具有至少约80%的序列同一性,并且最优选地与其具有至少约90%的序列同一性,更优选在与其至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%的序列同一性。

[0487] 如本领域中已知的,抗体的“恒定区”是指单独或组合的抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区。

[0488] 如本文可互换使用的术语“IgG Fc区”、“Fc区”、“Fc结构域”和“Fc”是指与通过木瓜蛋白酶消化IgG而获得的可结晶片段相关的IgG分子的部分。如本文所用,该术语涉及除第一恒定区免疫球蛋白结构域之外的抗体的恒定区,并且还涉及该区域的部分。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,以及IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域,以及这些结构域的柔性铰链N末端或其部分。对于IgA和IgM,Fc可包括J链。对于IgG,Fc包括免疫球蛋白结构域C γ 2和C γ 3(C γ 2和C γ 3)以及C γ 1(C γ 1)和C γ 2(C γ 2)之间的铰链。尽管Fc区的边界可以变化,但是人IgG重链Fc区通常被定义为包含其羧基末端的残基C226或P230,其中编号是根据Edelman等人,1969, Proc.Natl.Acad.Sci.USA63(1):78-85的EU索引,如Kabat等人,1991所述。通常,Fc结构域包含人IgG1恒定结构域的约氨基酸残基236至约447。示例性的人野生型IgG1 Fc结构域氨基酸序列在SEQ ID NO:31中列出。Fc多肽可以孤立地指该区域,或者在抗体或其抗原结合片段或Fc融合蛋白的上下文中指该区域。

[0489] 重链恒定结构域包含Fc区,并且还包含IgG重链的CH1结构域和铰链以及CH2和CH3(以及任选地IgA和IgE的CH4)结构域。

[0490] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的至少一种效应子功能。示例性的“效应子功能”

包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性;吞噬作用;下调细胞表面受体(例如B细胞受体)等。这种效应子功能通常需要将Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域或其抗原结合片段)组合,并且可以使用本领域已知的各种测定法进行评估用于评估此类抗体效应子功能。

[0491] “天然序列Fc区”包含与自然中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区及其天然存在的变体。

[0492] “变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。

[0493] “Fc受体”或“FcR”描述与抗体的Fc区结合的受体。在一些实施方案中,Fc γ R是天然人FcR。在一些实施方案中,FcR是结合IgG抗体(γ 受体)的FcR,并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括那些受体的等位基因变体和其他剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其胞质结构域。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见例如Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。FcR在例如Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods.4:25-34(1994);和de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)中进行了综述。本文中的术语“FcR”涵盖其他FcR,包括将来将要鉴定的那些。

[0494] 术语“Fc受体”或“FcR”还包括负责将母体IgG转移至胎儿的新生儿受体FcRn(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))和免疫球蛋白稳态的调节。测量与FcRn结合的方法是已知的(参见例如Ghetie和Ward.,Immunol.Today.18(12):592-598(1997);Ghetie等人,Nature Biotechnology,15(7):637-640(1997);Hinton等人,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);W02004/92219(Hinton等人)。

[0495] “效应子功能”是指归因于抗体的Fc区的生物学活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;下调细胞表面受体(例如B细胞受体);和B细胞活化。

[0496] “人效应子细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。在某些实施方案中,细胞表达至少Fc γ RIII并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞。效应子细胞可以从天然来源例如血液中分离。

[0497] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞毒性的一种形式,其中分泌的Ig结合到某些细胞毒性细胞(例如NK细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)上,使得这些细胞毒性效应子细胞特异性结合携带抗原的靶细胞,并随后用细胞毒素杀死靶细胞。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991)的第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,进行体外ADCC测定法,例如美国专利号5,500,362或5,821,337或者美国专利号6,737,056(Presta)中所述。用于此类测定法的有用的效应子细胞包括PBMC和NK细胞。备选地或另外地,可以在体内例如在动物模型中如

Clynes等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 (1998) 中公开的, 评估目标分子的ADCC活性。具有改变的Fc区氨基酸序列和增加或降低的ADCC活性的其他抗体描述于例如美国专利号7,923,538和美国专利号7,994,290。

[0498] 具有“增强的ADCC活性”的抗体是指与亲本抗体相比在体外或体内介导ADCC更有效的抗体, 其中抗体和亲本抗体在至少一个结构方面不同, 并且当测定法中使用的此类抗体和亲本抗体的量基本相同时。在一些实施方案中, 抗体和亲本抗体具有相同的氨基酸序列, 但是抗体是非岩藻糖基化的, 而亲本抗体是岩藻糖基化的。在一些实施方案中, 将使用本文公开的体外ADCC测定法来确定ADCC活性, 但是也考虑使用其他测定法或确定ADCC活性的方法, 例如在动物模型中等。在一些实施方案中, 具有增强的ADCC活性的抗体对Fc γ RIIIA具有增强的亲和力。在一些实施方案中, 具有增强的ADCC活性的抗体对Fc γ RIIIA (V158) 具有增强的亲和力。在一些实施方案中, 具有增强的ADCC活性的抗体对Fc γ RIIIA (F158) 具有增强的亲和力。

[0499] 具有“改变的”FcR结合亲和力或ADCC活性的抗体是与亲本抗体相比具有增强或减弱的FcR结合活性和/或ADCC活性的抗体, 其中抗体和亲本抗体在至少一个结构方面不同。“显示增加结合”FcR的抗体与亲本抗体相比以更好的亲和力结合了至少一种FcR。“显示降低结合”FcR的抗体与亲本抗体相比以更低的亲和力结合至少一种FcR。此类显示降低结合FcR的抗体可能与FcR几乎没有或没有明显的结合, 例如与天然序列IgG Fc区相比, 0-20%结合FcR。

[0500] “对Fc γ RIIIA的增强的亲和力”是指对Fc γ RIIIA (在某些情况下, 也称为CD 16a) 具有比亲本抗体更大的亲和力的抗体, 其中抗体和亲本抗体在至少一个结构方面不同。在一些实施方案中, 抗体和亲本抗体具有相同的氨基酸序列, 但是抗体是非岩藻糖基化的, 而亲本抗体是岩藻糖基化的。可以使用任何适合的方法来确定对Fc γ RIIIA的亲和力。在一些实施方案中, 通过本文所述的方法确定对Fc γ RIIIA的亲和力。在一些实施方案中, 对Fc γ RIIIA具有增强的亲和力的抗体具有增强的ADCC活性。在一些实施方案中, 对Fc γ RIIIA具有增强的亲和力的抗体对Fc γ RIIIA (V158) 具有增强的亲和力。在一些实施方案中, 对Fc γ RIIIA具有增强的亲和力的抗体对Fc γ RIIIA (F158) 具有增强的亲和力。

[0501] L-岩藻糖 (也称为6-脱氧-L-半乳糖) 是一种单糖, 其是动物中一些N-和O-连接的聚糖和糖脂的组分。参见Becker和Lowe, Glycobiology 13:41R-51R (2003)。通常将岩藻糖作为末端修饰物添加到聚糖上, 包括连接在血型抗原、选择素和抗体上的聚糖。岩藻糖可以通过特定的岩藻糖基转移酶通过 α (1, 2)-、 α (1, 3)-、 α (1, 4)-和 α (1, 6)-键与聚糖连接。 α (1, 2)-岩藻糖键通常与H-血型抗原相关。 α (1, 3)-和 α (1, 4)-岩藻糖键与LewisX抗原的修饰相关。 α (1, 6)-岩藻糖键与N-连接的GlcNAc分子 (例如抗体上的分子) 相关。

[0502] 将参考用于寡糖描述的常用命名法描述本发明的碳水化合物部分。使用该命名法的碳水化合物化学的综述可见于Hubbard和Ivatt (1981) Ann. Rev. Biochem. 50:555-583。该命名法包括例如Man代表甘露糖; GlcNAc代表2-N-乙酰氨基葡萄糖; Gal代表半乳糖; Fuc代表岩藻糖; 和Glc代表葡萄糖。唾液酸用5-N-乙酰神经氨酸的简写NeuNAc和5-甘氨酸神经氨酸的NeuNGc来描述 (IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1982, J. Biol. Chem. 257:3347-3351; (1982) J. Biol. Chem. 257:3352)。

[0503] 本发明的碳水化合物结构出现在表达为N-连接的寡糖的蛋白质上。“N-连接的糖

基化”是指碳水化合物部分经由GlcNAc与多肽链中的天冬酰胺残基连接。N-连接的碳水化合物均含有共同的Man1-6 (Man1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -R核心结构。因此,在所述的核心结构中,R代表产生的糖蛋白的天冬酰胺残基。产生的蛋白质的序列将含有天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸和天冬酰胺-X-半胱氨酸,其中X是脯氨酸以外的任何氨基酸(Asn-Xaa-Ser/Thr)。相反,“O-连接的”碳水化合物的特征在于共同的核心结构,该核心结构是连接于苏氨酸或丝氨酸的羟基的GalNAc,但不需要共有序列。在N-连接的碳水化合物中,最重要的是“复杂的”N-连接的碳水化合物,例如本文所述的“双触角”结构。

[0504] 本领域技术人员将认识到糖蛋白免疫球蛋白G (IgG) 与不含、含有一个或两个半乳糖残基的三种类型的复杂双触角结构有关(Wormland等人,1997,Biochemistry 36:1370-1380),分别通常称为G0、G1和G2。对于IgG类的人抗体分子,每个分子都有N连接的寡糖,连接在Fc区的CH2域的内表面的 β -4转角的Asn 297的酰胺侧链上(Beale和Feinstein,1976, Q.Rev.Biophys.9:253-259;Jefferis等人,1995,Immunol.Letts.44:111-117)。连接在IgG CH2域Asn 297上的寡糖部分是复杂的双触角类型,具有确定的六糖核心结构和可变的外部糖残基(参见Jefferis等人,1997,同上;Wyss和Wagner,1996,Current Opinions in Biotech.7:409-416)。核心结构(GlcNAc2Man3GlcNAc)是双触角寡糖的典型特征,在图1中示意性地表示。

[0505] 由于每个核心结构可以具有二等分的N-乙酰氨基葡萄糖胺、核心岩藻糖和半乳糖或唾液酸外部糖,所以共有36个结构独特的寡糖可占据Asn 297位点(Jefferis和Lund,同上)。还应认识到,在特定的CH2结构域内,由于在两条链Fc结构域内的任一Asn 297残基处连接的不同寡糖链,Asn 297处的糖基化可能是不对称的。例如尽管在分泌单个抗体的细胞中合成的重链在其氨基酸序列上可以是均质的,但是其通常被差异糖基化,从而导致大量结构独特的Ig糖型。

[0506] 在国际专利公开号W0 99/22764的第7页中描述了在IgG的CH2结构域中发现的复杂寡糖结构的主要类型(也称为“糖型”)。

[0507] 根据本发明,G0是指其中不存在末端唾液酸(NeuAc)或Gal1的双触角结构,G1是指具有一个Gal1且没有NeuAc的双触角结构,并且G2是指具有两个末端Gal1且没有NeuAc的双触角结构。参见例如图2A-2G,描绘了G0、G1、G-1和G2的示例性结构。

[0508] “非岩藻糖基化的”抗体或“缺乏岩藻糖”的抗体是指在其恒定区糖基化中缺乏岩藻糖的IgG1或IgG3同种型抗体。人IgG1或IgG3的糖基化在Asn297处发生,因为核心岩藻糖基化的双触角复合物寡糖糖基化以多达2个Gal1残基终止。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗体在Asn297处缺乏岩藻糖。根据末端Gal1残基的量,将这些结构命名为G0、G1(1,6或1,3)或G2聚糖残基。参见例如Raju,T.S.,BioProcess Int.1:44-53(2003)。抗体Fc的CHO型糖基化描述于例如Routier,F.FL,Glycoconjugate J.14:201-207(1997)。各种抗体糖型显示在图2A-2G中。

[0509] 在一些实施方案中,本文可互换使用的“岩藻糖基”或“非岩藻糖基化的”抗体是指经糖工程改造以缺乏核心岩藻糖的抗体。聚糖部分中岩藻糖含量降低的抗体与Fc γ RIIIa(CD16)的亲合力增加,因此具有增强的活性依赖性细胞毒性(ADCC)活性。可以使用Potelligent®CHOK1SV细胞系(Lonza Biologics)生产非岩藻糖基抗体,该细胞系缺少负责添加岩藻糖的基因(α 1,6-岩藻糖基转移酶)的两个等位基因。还可以通过以各种方式修

饰寡糖的生物合成活性来产生非岩藻糖基化的抗体或岩藻糖减少的抗体。例如在生产细胞系的高尔基体中过表达N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III (GnTIII) 产生与抗体的Fc恒定区相关的二等分的寡糖结构,并抑制岩藻糖基化。在这样的表达系统中,GnTIII表达的水平与非岩藻糖基化的IgG1糖型的产生以及导致增强的ADCC活性相关。通过使用糖类类似物,例如但不限于如W0 2012/019165中所述的岩藻糖类类似物,在细胞培养中岩藻糖基化作用也可以降低。因此,可以使用本领域众所周知的多种方法来产生非岩藻糖基化的或岩藻糖减少的抗体。

[0510] 在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗体对Fc γ RIIIA具有增强的亲和力。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗体对Fc γ RIIIA (V158) 具有增强的亲和力。在一些实施方案中,非岩藻糖基化抗体对Fc γ RIIIA (F158) 具有增强的亲和力。

[0511] “糖型”是指包含各种碳水化合物单元的连接复杂的低聚糖结构。这样的结构描述在例如Essentials of Glycobiology Varki等人,eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY (1999) 中,该文献也提供了标准糖生物学命名法的综述。这样的糖型包括但不限于G2、G1、G0、G-1和G-2(参见例如国际专利公开号W0 99/22764)。

[0512] “糖基化模式”定义为共价连接于蛋白质(例如糖型)的碳水化合物单元的模式以及糖型共价连接于蛋白质的肽骨架、更具体地说是免疫球蛋白的位点。

[0513] 在一些实施方案中,在未糖修饰的CHO宿主细胞中重组表达的一批抗体的至少85%在Asn297处是岩藻糖基化的。当涉及包含多种抗体的组合物时,如果组合物中少于约5%的抗体在至少一个Asn297包含岩藻糖,则认为该抗体是非岩藻糖基化的。甚至更优选地,非岩藻糖基化水平是约100%,即,使用用于测量抗体的岩藻糖基化的标准方法,在任一重链Asn297糖型上均未检测到岩藻糖。测量岩藻糖的方法包括本领域已知的任何方法,包括本文所述的方法。在一些实施方案中,岩藻糖在包含多种非岩藻糖基化的抗体的组合物中是检测不到。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗体具有增强的ADCC活性。

[0514] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下靶细胞的裂解。经典补体途径的活化通过补体系统的第一组分(C1q)与(适当亚类的)抗体的结合而被起始,所述抗体与它们的同源抗原结合。为了评估补体活化,可进行CDC测定法,例如在Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163 (1996) 中描述的。具有改变的Fc区氨基酸序列和增加或减少的C1q结合能力的抗体描述于例如美国专利号6,194,551B1、美国专利号7,923,538、美国专利号7,994,290和W01999/51642。还参见例如Idusogie等人,J.。

[0515] 如本文所用,术语“野生型氨基酸”、“野生型IgG”、“野生型抗体”或“野生型mAb”是指在某一群体(例如人、小鼠、大鼠、细胞等)内天然存在的氨基酸或核酸的序列。

[0516] 在本文中可互换使用的“5型C-X-C趋化因子受体”或“CXCR5”(在本领域中也称为“CD185”和“伯基特淋巴瘤受体1(BLR1)”)是一种表达于某些细胞上G蛋白偶联受体。术语CXCR5包括CXCR5同源物和直系同源物,包括人、食蟹猴、大鼠、兔和小鼠等。如本文所用,“CXCR5”是指哺乳动物CXCR5,例如人、大鼠或小鼠,以及非人灵长类、牛、羊或猪CXCR5。CXCR5的非限制性示例性实例包括人(参见例如Genbank登录号P60568,SEQ ID NO:32)、食蟹猴(参见例如Genbank登录号Q29615,SEQ ID NO:33)和小鼠(SEQ ID NO:34)CXCR5。术语“CXCR5”还涵盖此类CXCR5分子的片段、变体、异形体和其他同源物。变体CXCR5分子通常特

征在于具有与天然存在的CXCR5相同类型的活性,例如结合CXCR5受体的能力、诱导受体介导的活性的能力以及结合或不结合本发明的抗体或其抗原结合片段的能力。

[0517] CXCR5可以包含CXCR5的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个、十二个或更多个或者十五个或更多个表面可及残基。图6显示了野生型小鼠和人CXCR5的氨基酸序列,其中给示例性的表面可及残基加下划线。当CXCR5包含CXCR5的同多聚体形式时,靶标可以包含CXCR5的第一个亚基的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多、十二个或更多或十五个或更多个表面可及残基,以及CXCR5的第二个亚基的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多、九个或更多、十个或更多、十二个或更多或十五个或更多个的表面可及残基。靶分子可以包含来自CXCR5的已知表位。

[0518] 如前所述,野生型人CXCR5 (hCXCR5) 和小鼠CXCR5 (mCXCR5) 的比对的氨基酸序列指示(通过加下划线)蛋白质的各个示例性细胞外区域(标记为“N”、“L1”、“L2”和“3”)显示在图5中。

[0519] 如本文其他地方所概述的,抗体分子的某些位置可以改变。本文所用的“位置”是指蛋白质的序列中的位置。位置可以顺序编号,或根据既定格式编号,例如可以使用EU索引和Kabat索引对抗体的氨基酸残基进行编号。例如位置297是人抗体IgG1中的位置。如上所概述的,通常通过与其他亲本序列的比对确定对应的位置。

[0520] 本文所用的“残基”是指蛋白质中的位置及其相关的氨基酸同一性。例如天冬酰胺297(也称为Asn297,也称为N297)是人抗体IgG1中的残基。

[0521] 如本文可互换使用的术语“Tfh细胞”或“Tfh”或“真正Tfh”或“生发中心Tfh细胞”或“GC Tfh细胞”是指在生发中心(GC)内发现的滤泡辅助性T细胞,生发中心是由GC Tfh细胞、GC B细胞、滤泡树突状细胞(FDC)、巨噬细胞和基质组成的结构。参见Crotty, 2014, *Immunity* 41(4):529-542。通过B细胞滤泡归巢受体CXCR5的组成型表达来鉴定Tfh细胞。在功能上,Tfh细胞向B细胞提供指导性信号,以指导同种型转换、体细胞超突变以及将细胞快速分裂至种子生发中心。

[0522] 在本文中可互换使用的术语“Tfh样细胞”、“循环Tfh细胞”和“cTfh”是指已经离开生发中心的Tfh细胞。离开GC后,细胞获得了更少活化、更少极化的表型,被称为“循环滤泡辅助性T细胞”(cTfh)或“Tfh样细胞”,参见Crotty, 2014, *Immunity* 41(4):529-542。这些细胞表达CXCR5。与生发中心Tfh细胞(即“真正Tfh细胞”或“GC Tfh细胞”或“Tfh”)相比,cTfh细胞(即Tfh样细胞)表达降低水平的ICOS、Bcl-6和细胞活化标志物例如CD69和HLA-DR,但在通过同源抗原重新活化后,仍保持体外刺激B细胞中Ab产生和Ig类别转换的能力。

[0523] 如本领域中已知的,如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸链,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶掺入链中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在,可以在链装配之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分打断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。其他类型的修饰包括例如“帽”,用类似物取代一个或

多个天然核苷酸,核苷酸间修饰例如具有不带电荷的键的那些(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的键的那些(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等),含有悬垂部分的那些,例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚L-赖氨酸等),具有嵌入剂的那些(例如吡啶、补骨脂素等),含有螯合剂的那些(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等),含有烷基化剂的那些,具有修饰的键的那些(例如 α 异头核酸等),以及多核苷酸的未修饰形式。此外,糖中通常存在的任何羟基可被例如磷酸酯基、磷酸基取代,被标准保护基团保护,或被活化以制备与另外的核苷酸连接的另外的键,或者可与固体支持物缀合。5'和3'末端的OH可被磷酸化或被1-20个碳原子的胺或有机加帽基团部分取代。其他羟基也可以被衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括例如2'-O-甲基-,2'-O-烯丙基,2'-氟-或2'-叠氮基-核糖,碳环糖类类似物, α -或 β -异头糖,差向异构糖例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚酮糖,无环类似物和无碱基核苷类似物如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯键可以被替代的连接基团取代。这些替代的连接基团包括但不限于其中磷酸被P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)取代的实施方案,其中每个R或R'独立地为H或者取代或未取代的烷基(1-20 C),任选地含有醚(-O-)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳基。并非多核苷酸中的所有键都需要相同。先前的描述适用于本文所指的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0524] 如本文所用,“载体”是指能够在宿主细胞中递送并且优选地表达一个或多个目的基因或序列的构建体。载体的实例包括但不限于病毒载体,裸露的DNA或RNA表达载体,质粒、粘粒或噬菌体载体,与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体,包裹在脂质体中的DNA或RNA表达载体,以及某些真核细胞,例如生产者细胞。

[0525] “宿主细胞”包括个体细胞或细胞培养物,其可以是或已经是用于掺入多核苷酸插入物的载体的接受者。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且由于自然、偶然或有意的突变,后代不一定与原始亲代细胞完全相同(在形态或基因组DNA互补上)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸体内转染和/或转化的细胞。

[0526] 宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。示例性的真核细胞包括哺乳动物细胞,例如灵长类动物或非灵长类动物细胞;真菌细胞,例如酵母;植物细胞;和昆虫细胞。

[0527] 根据本发明,可以使用对细胞培养以及对蛋白质或多肽表达敏感的任何宿主细胞。在某些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物。可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域众所周知的并且包括可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的许多永生化的细胞系。非限制性示例性哺乳动物细胞包括但不限于NS0细胞、HEK 293和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞及其衍生物,例如293-6E和CHO DG44细胞、CHO DXB11和**Potelligent**[®]CHOK1SV细胞(BioWa/Lonza, Allendale, NJ)。哺乳动物宿主细胞还包括但不限于人宫颈癌细胞(HeLa, ATCC CCL2)、幼仓鼠肾(BHK, ATCC CCL 10)细胞、猴肾细胞(COS)和人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)。可以根据本发明使用的哺乳动物细胞的其他非限制性实例包括人成视网膜细胞(**PER.C6**[®];CruCell, Leiden, The Netherlands);SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL1651);人胚胎肾细胞系293(HEK 293)或亚克隆用于在悬浮培养中生长的293细胞(Graham等人,1977, J. Gen Virol. 36:59);小鼠睾丸支持细胞(TM4, Mather, 1980,

Biol.Reprod.23:243-251);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1 587);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等人,1982,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68);MRC 5细胞;FS4细胞;人肝癌细胞系(Hep G2);以及许多骨髓瘤细胞系,包括但不限于BALB/c小鼠骨髓瘤系(NS0/1,ECACC编号:85110503)、NS0细胞和Sp2/0细胞。

[0528] 另外,根据本发明,可以利用表达多肽或蛋白质的任何数量的商业和非商业可获得的细胞系。本领域技术人员将理解,不同的细胞系可能具有不同的营养要求和/或可能需要不同的培养条件以实现最佳生长以及多肽或蛋白质表达,并且能够根据需要改变条件。

[0529] 本发明包括本领域已知或本文公开的用于产生目的蛋白质的任何真核表达系统,例如在昆虫细胞系统、酵母表达系统或哺乳动物细胞系统中表达,例如但不限于CHO细胞。

[0530] 如本文所用,“表达控制序列”是指指导核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子(例如组成型或诱导型启动子)或增强子。表达控制序列与待转录的核酸序列可操作地连接。

[0531] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益或期望的临床结果的方法。为了本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于以下一项或多项:提高的生存率(降低的死亡率),对疾病的炎症反应降低,组织纤维化的量降低,疾病病变的外观改善,将病理性病变限制在病灶部位,疾病损害程度降低,疾病持续时间减少和/或与疾病相关的症状的数量、程度或持续时间减少。该术语包括施用本发明的化合物或试剂以预防或延迟疾病的症状、并发症或生化指标的发作,减轻症状或者阻止或抑制疾病、病况或病症的进一步发展。治疗可以是预防性的(预防或延缓疾病的发作,或预防其临床或亚临床症状的表现),或疾病表现后症状的治疗性抑制或减轻。

[0532] “缓解”是指与不施用CXCR5抗体相比,减轻或改善一种或多种症状。“缓解”还包括缩短或减少症状的持续时间。

[0533] 如本文所用,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以影响任何一种或多种有益或期望结果的量。在更具体的方面,有效量预防、减轻或缓解疾病或感染的症状,和/或延长所治疗的受试者的存活期。对于预防用途,有益或期望结果包括消除或降低风险,减轻严重程度或延缓疾病的发作,包括疾病的生化、组织学和/或行为症状,其并发症以及在疾病发展过程中出现的中间病理表型。对于治疗用途,有益或期望结果包括以下临床结果,例如减轻CXCR5介导的疾病、病症或病况的一种或多种症状,减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量,增强另一种药物的作用和/或延缓患者疾病的发展。有效剂量可以在一次或多次施用中施用。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接地完成预防性或治疗性处理的量。如在临床上下文中所理解的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以在与另一种药物、化合物或药物组合物组合时达到或不达到。因此,可以在施用一种或多种治疗剂的情况下考虑“有效剂量”,并且如果与一种或多种其他事情组合可以达到或实现期望的结果,则可以认为单一剂被以有效量给予。

[0534] “个体”或“受试者”是哺乳动物,更优选地是人。哺乳动物还包括但不限于农场动物(例如牛、猪、马、鸡等)、运动动物、宠物、灵长类、马、狗、猫、小鼠和大鼠。在一些实施方案中,认为个体处于由CXCR5与其受体结合和由此介导的信号传导介导或与其相关的疾病、病

症或病况的风险中。在某些实施方案中,所述受试者患有自身免疫性疾病、病症或病况,例如1型糖尿病。在某些实施方案中,受试者需要免疫抑制疗法。

[0535] 如本文所用,“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时允许成分保留生物学活性并且与受试者的免疫系统不反应的任何材料。实例包括但不限于任何标准药物运载体,例如磷酸盐缓冲的盐溶液、水、乳液例如油/水乳液和各种类型的润湿剂。用于气雾剂或肠胃外给药的优选稀释剂是磷酸盐缓冲的盐水(PBS)或生理盐水(0.9%)。通过众所周知的常规方法配制包含此类运载体的组合物(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 和Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000)。

[0536] 本文描述了示例性的方法和材料,尽管与本文描述的方法和材料相似或等同的方法和材料也可以用于本发明的实践或测试中。材料、方法和实例仅是说明性的,而无意于进行限制。

[0537] II. 抗CXCR5抗体

[0538] 本发明涉及与CXCR5结合的抗体。优选地,抗体特异性结合CXCR5,即,它们结合CXCR5,但是它们未检测到与其他分子结合或以较低的亲和力结合。本发明还涉及表现出改变的效应子功能的抗CXCR5抗体。在一些实施方案中,改变的效应子功能是增加的ADCC。在一些实施方案中,抗体缺乏或含有可检测地降低水平的岩藻糖(即,它们是非岩藻糖基化的)。本发明还涉及包含此类抗体的组合物以及此类抗体的用途,包括治疗和药物用途。

[0539] 在一个实施方案中,本公开内容提供了以下或包含以下的组合物(包括药物组合物)中任一项,具有衍生自任何下列抗体:11G2、41A10和5H7中的一种的轻链序列或其片段和重链或其片段的抗体。

[0540] 可用于本发明的抗体可以包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(例如Fab、Fab', F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合抗体、双特异性抗体、异源缀合物抗体、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体片段的融合蛋白(例如结构域抗体)、人源化的抗体以及包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。抗体可以是鼠、大鼠、人或任何其他来源的抗体(包括嵌合或人源化的抗体)。在一些实施方案中,CXCR5抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是人或人源化的抗体。

[0541] 本发明的CXCR5抗体可以通过本领域已知的任何方法制备。产生人和小鼠抗体的通用技术是本领域已知的和/或在本文中描述。

[0542] 在初步鉴定之后,候选CXCR5抗体的活性可以通过已知用于测试被靶向的生物学活性的生物测定法进一步证实和细化。在一些实施方案中,体外细胞测定法用于进一步表征候选CXCR5抗体。例如生物测定法可用于直接筛选候选物。实施例中详细描述了一些鉴定和表征CXCR5抗体的方法。

[0543] 在某些方面,抗体或其抗原结合片段包含选自以下序列的至少一个氨基酸序列:小鼠11G2 VH、小鼠11G2 VL、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)、h11G2VH(XC354)、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL

(XC347)、h11G2 VL (XC348)、h11G2 VL (XC349)、小鼠41A10 VH、小鼠41A10 VL、h41A10 VH (XC147)、h41A10 VH (XC148)、h41A10 VH (XC150)、h41A10 VL (XC142)、h41A10 VL (XC143)、h41A10 VL (XC144)、h41A10 VL (XC145)、h41A10 VL (XC146)、h41A10 VL (XC149)、小鼠5H7 VH和小鼠5H7 VL。

[0544] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段与以上任何抗体竞争结合CXCR5。

[0545] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含VH氨基酸序列和VL氨基酸序列,其包含以下组合:与以下中的一种或多种竞争结合人CXCR5的抗体或其抗原结合片段:小鼠11G2、嵌合11G2、h11G2 VH (XC152)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC152)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC152)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC152)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC152)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC152)/VL (XC348)、h11G2 VH (XC152)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC155)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC155)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC155)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC155)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC155)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC155)/VL (XC3484)、h11G2 VH (XC155)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC156)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC156)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC156)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC156)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC156)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC156)/VL (XC348)、h11G2 VH (XC156)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC157)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC157)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC157)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC157)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC157)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC157)/VL (XC348)、h11G2 VH (XC157)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC350)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC350)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC350)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC350)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC350)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC350)/VL (XC348)、h11G2 VH (XC350)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC351)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC351)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC351)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC351)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC351)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC351)/VL (XC348)和h11G2 VH (XC351)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC352)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC352)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC352)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC352)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC352)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC352)/VL (XC348)、h11G2 VH (XC352)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC353)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC353)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC353)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC353)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC353)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC353)/VL (XC348)、h11G2 VH (XC353)/VL (XC349)、h11G2 VH (XC354)/VL (XC151)、h11G2 VH (XC354)/VL (XC153)、h11G2 VH (XC354)/VL (XC154)、h11G2 VH (XC354)/VL (XC346)、h11G2 VH (XC354)/VL (XC347)、h11G2 VH (XC354)/VL (XC348)、h11G2 VH (XC354)/VL (XC349)、小鼠41A10、嵌合41A10、h41A10 VH (XC147)/VL (XC142)、h41A10 VH (XC147)/VL (XC143)、h41A10 VH (XC147)/VL (XC144)、h41A10 VH (XC147)/VL (XC145)、h41A10 VH (XC147)/VL (XC146)、h41A10 VH (XC147)/VL (XC149)、h41A10 VH (XC148)/VL (XC142)、h41A10 VH (XC148)/VL (XC143)、h41A10 VH (XC148)/VL (XC144)、h41A10 VH (XC148)/VL (XC145)、h41A10 VH (XC148)/VL (XC146)、h41A10 VH (XC148)/VL (XC149)、h41A10 VH (XC150)/VL (XC142)、h41A10 VH (XC150)/VL (XC143)、h41A10 VH (XC150)/VL (XC144)、h41A10 VH (XC150)/VL (XC145)、h41A10 VH (XC150)/VL (XC146)、h41A10 VH (XC150)/VL (XC149)、小鼠5H7和嵌合5H7。

[0546] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段与上述任何抗体竞争结合CXCR5。

[0547] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51

的至少一个的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0548] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段还包含在SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56、57的至少一个的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0549] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3,和在SEQ ID NO:6的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0550] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3,和在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0551] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3,和在SEQ ID NO:12的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0552] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3,和在SEQ ID NO:52的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0553] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段还包含在SEQ ID NO:6的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,和在SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的至少一个的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0554] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段还包含在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,和在SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的至少一个的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0555] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段还包含在SEQ ID NO:12的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,和在SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的至少一个的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0556] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段还包含在SEQ ID NO:52的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,和在SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的至少一个的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0557] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段还包含在SEQ ID NO:27的氨基酸序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,和在SEQ ID NO:26的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0558] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在保藏在ATCC具有登记号PTA-124324的质粒的插入物编码的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0559] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在保藏在ATCC具有登记号PTA-124323的质粒的插入物编码的氨基酸序列中所示的CDR-H1,CDR-H2和CDR-H3。

[0560] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在保藏在ATCC具有登记号PTA-124324的质粒的插入物编码的氨基酸序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,和在保藏在ATCC具有登记号PTA-124323的质粒的插入物编码的氨基酸序列中所示的CDR-H1,CDR-H2和CDR-H3。

[0561] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段与以上任何抗体竞争结合CXCR5。

[0562] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的

CDR-L1,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3,包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2,和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H3。

[0563] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3,包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-H3。

[0564] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-L2,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-L3,包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H2,和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H3。

[0565] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L2,包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L3,包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H2,和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H3。

[0566] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L2,包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L3,包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H2,和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H3。

[0567] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含如下:包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L2,包含SEQ ID NO:16氨基酸序列的CDR-L3,包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR-H2,和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR-H3。

[0568] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:6、10、12、36、52、53、54、55、56和57的至少一个序列中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3氨基酸序列。

[0569] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:1、5、35、47、48、49、50和51的至少一个序列中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列。

[0570] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含在SEQ ID NO:5中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列。

[0571] 抗体或其抗原结合片段可以包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VH可以包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VH可以包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0572] 抗体或其抗原结合片段可以包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VH可以包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VH可以包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0573] 抗体或其抗原结合片段可以包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VH可以包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VH可以包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0574] 抗体或抗原结合片段可以包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VL可以包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VL可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0575] 抗体或抗原结合片段可以包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VL可以包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VL可以包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0576] 抗体或其抗原结合片段可以包含VH,所述VH包含与氨基酸序列SEQ ID NO:17至少90%相同的氨基酸序列。VH可以包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VH可以包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0577] 抗体或其抗原结合片段可以包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VH可以包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VH可以包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0578] 抗体或抗原结合片段可以包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VL可以包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VL可以包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0579] 抗体或抗原结合片段可以包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:58的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。VL可以包含与SEQ ID NO:58的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。VL可以包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0580] 在一方面,非岩藻糖基化的抗体或其抗原结合片段可以包含重链,所述重链包含选自包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VH的VH,并且还包含IgG1恒定结构域(SEQ ID NO:31)。在一方面,所述抗体变体包含对全长重链的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守或非保守取代,和/或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个添加和/或缺失。在另一方面,所述变体与全长重链共享至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性,并且其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合CXCR5。

[0581] 本公开内容的非岩藻糖基化的抗体可以包含轻链,所述轻链含有包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VL,其中抗体进一步包含轻链恒定结构域。如本文其他地方更全面地阐述的,非岩藻糖基化的抗体轻链恒定结构域可以选自C κ 或C λ 恒定区,例如SEQ ID NO:30的C κ 恒定区。在一方面,所述抗体变体包含对全长轻链的1、2、3、4、5、6、7、8、

9、10、11、12、13、14或15个保守或非保守取代,和/或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个添加和/或缺失。在另一方面,所述变体与全长轻链共享至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性,并且其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合CXCR5。

[0582] 抗体或抗原结合片段可以包含HC,所述HC包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。HC可以包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。优选地,抗体是非岩藻糖基化的。

[0583] 抗体或抗原结合片段可以包含LC,所述LC包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。LC可以包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。优选地,抗体是非岩藻糖基化的。

[0584] 优选地,本发明的抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的。甚至更优选地,抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的并且与岩藻糖基化的其他方面相同的抗体相比,表现出增加的ADCC效应子功能。

[0585] 种系取代

[0586] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含以下重链CDR序列:(i)包含SEQ ID NO:7的CDR-H1,包含SEQ ID NO:8的CDR-H2,和包含SEQ ID NO:9或11的CDR-H3;和/或(ii)以下轻链CDR序列:包含SEQ ID NO:2的CDR-L1,包含SEQ ID NO:3的CDR-L2,和包含SEQ ID NO:4的CDR-L3。这些是小鼠CDR,并且优选地移植或以其他方式添加在人VH和VL结构域的背景中。各种各样的受体人种系序列是可用的并且“人源化”非人物种抗体以用于人的方法在本领域中是众所周知的,并且也在本文其他地方讨论。因此,本领域技术人员将理解,以上小鼠CDR序列可置于人V结构域氨基酸序列的背景中。这样做,通常改变受体人种系序列以保留原始亲本(即供体)抗体的抗体结合和其他所需特性。CDR和框架区(FW)都可以如下设计。

[0587] 在某些实施方案中,相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列,在CDR-L1中产生不超过11个、或不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个取代。在某些实施方案中,相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列,在CDR-L2中产生不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个取代。在某些实施方案中,相对于SEQ ID NO:4的氨基酸序列,在CDR-L3中产生不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个取代。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:7的氨基酸序列,在CDR-H1中产生不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个取代。在一些实施方案中,相对于相对于SEQ ID NO:8的氨基酸序列,在CDR-H2中产生不超过17个、不超过16、不超过15个、不超过14个、不超过13个、不超过12个、不超过11个、或不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个取代。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:9的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:11的氨基酸序列,在CDR-H3中产生不超过12个、不超过11个、或不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个,不超过2个或不超过1个取代。在某些实施方案中,取代不改变结合亲和力(K_D)值超过1000倍、超过100倍或10倍。在某些实施方案中,取代是根据表1的保守取代。

[0588] 在某些实施方案中,取代是人种系取代,其中(供体)CDR残基被对应的人种系(受体)残基取代,以增加人氨基酸含量并潜在地降低抗体的免疫原性,如在例如美国专利申请公开号2017/0073395和Townsend等人,2015,Proc.Nat.Acad.Sci.USA112(50):15354-15359中所述。例如如果使用人种系DPK9框架,并且将示例性抗体小鼠或人源化的(XC154)11G2 VL进行比较,则11G2 VL(小鼠和人源化的XC154)抗体(SEQ ID NO:2)的CDR-L1和人种系DPK9的比对如下:

	位置	27	28	29	30	31	32	33	34	35
[0589]	人种系DPK9	Q	S	I	S	S	Y	L	N	W
	11G2 VL (SEQ ID NO:2)	E	S	Y	E	Y	H	G	T	S

[0590] 对于28位氨基酸(斜体),人种系残基(受体)和对应的11G2 VL(XC154)残基(供体)是相同的,并且种系取代是不可能的。对于位置27、29、30、31、32、33、34和35(粗体和加下划线),人种系(受体)残基和对应的11G2 VL(XC154)(供体)残基是不同的。在这些位置上的11G2 VL(XC154)残基可以用对应的人种系DPK9残基替换,以进一步增加人残基含量。每个重链和轻链CDR都可以遵循相同的过程,以增加人氨基酸残基的含量,同时保留诸如表位结合、亲和力等结合特征,同时将小鼠残基的含量降至最低,从而减少任何潜在的免疫原性,例如对人体内抗体的人抗小鼠抗体(HAMA)免疫应答。

[0591] 用于在抗体CDR中引入人种系残基的方法和文库在美国美国专利申请公开号2017/0073395和Townsend等人,2015,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.112(50):15354-15359中详细描述,并且两者均通过引用整体并入本文。

[0592] 抗体或其抗原结合片段可以含有包含人种系VH框架序列的VH框架。VH框架序列可以来自人VH3种系、VH1种系、VH5种系或VH4种系。优选的人种系重链框架是衍生自VH1、VH3或VH5种系的框架。例如可以使用以下种系的VH框架:IGHV3-23、IGHV3-7或IGHV1-69(种系名称基于IMGT种系定义)。优选的人种系轻链框架是衍生自V κ 或V λ 种系的框架。例如可以使用来自以下种系的VL框架:IGKV1-39或IGKV3-20(种系名称基于IMGT种系定义)。备选地或另外地,框架序列可以是人种系共有框架序列,例如人V λ 1共有序列、V κ 1共有序列、V κ 2共有序列、V κ 3共有序列、VH3种系共有序列、VH1种系共有序列、VH5种系共有序列或VH4种系共有序列。人种系框架的序列可从各公共数据库获得,例如V-base、IMGT、NCBI或Abysis。

[0593] 抗体或其抗原结合片段可以含有包含人种系VL框架序列的VL框架。VL框架可包含一个或多个氨基酸取代、添加或缺失,同时仍保持与其来源的种系的功能和结构相似性。在一些方面,VL框架与人种系VL框架序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同。在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含VL框架,所述VL框架包含相对于人种系VL框架序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个氨基酸取代、添加或缺失。在一些方面,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代、添加或缺失仅在框架区中。在一些方面,同一性%基于与VL的相似性,但不包括本文中定义为CDR的那些片段。

[0594] 人种系VL框架可以是DPK9(IMGT名称:IGKV1-39)的框架。人种系VL框架可以是DPK12(IMGT名称:IGKV2D-29)的框架。人种系VL框架可以是DPK18(IMGT名称:IGKV2-30)的框架。人种系VL框架可以是DPK24(IMGT名称:IGKV4-1)的框架。人种系VL框架可以是HK102_V1(IMGT名称:IGKV1-5)的框架。人种系VL框架可以是DPK1(IMGT名称:IGKV1-33)的框架。人

种系VL框架可以是DPK8 (IMGT名称:IGKV1-9)的框架。人种系VL框架可以是DPK3 (IMGT名称:IGKV1-6)的框架。人种系VL框架可以是DPK21 (IMGT名称:IGKV3-15)的框架。人种系VL框架可以是Vg_38K (IMGT名称:IGKV3-11)的框架。人种系VL框架可以是DPK22 (IMGT名称:IGKV3-20)的框架。人种系VL框架可以是DPK15 (IMGT名称:IGKV2-28)的框架。人种系VL框架可以是DPL16 (IMGT名称:IGLV3-19)的框架。人种系VL框架可以是DPL8 (IMGT名称:IGLV1-40)的框架。人种系VL框架可以是V1-22 (IMGT名称:IGLV6-57)的框架。人种系VL框架可以是人Vλ共有序列的框架。人种系VL框架可以是人Vλ1共有序列的框架。人种系VL框架可能是人Vλ3共有序列的框架。人种系VL框架可以是人Vκ共有序列的框架。人种系VL框架可以是人Vκ1共有序列的框架。人种系VL框架可以是人Vκ2共有序列的框架。人种系VL框架可以是人Vκ3共有序列的框架。

[0595] 在一些方面,VL框架是DPK9。还预测其他类似的框架区递送本发明的有利抗体,包含SEQ ID NO:2、3、4、7、8、9、11、14、15、16的CDR;和由以下VL氨基酸序列指定的CDR:1、5、13、28、35、37、39、47、48、48、50、51、58、59、60、61、62、97、98,包括DPK5、DPK4、DPK1、IGKV1-5*01、DPK24、DPK21、DPK15、IGKV1-13*02、IGKV1-17*01、DPK8、IGKV3-11*01和DPK22,其分别与DPK-9的FW区包含99、97、97、96、80、76、66、97、97、96、76和74%的同一性,以及在共同结构特征中的一个或几个氨基酸差异(Kabat编号)(A)CDR的正下方的残基(游标区)、L2、L4、L35、L36、L46、L47、L48、L49、L64、L66、L68、L69、L71,(B)VH/VL链包装残基:L36、L38、L44、L46、L87和(C)规范CDR结构支持残基L2、L48、L64、L71(参见Lo,“Antibody Humanization by CDR Grafting”,(2004)Antibody Engineering,Vol.248,Methods in Molecular Biology pp 135-159以及O'Brien和Jones,“Humanization of Monoclonal Antibodies by CDR Grafting”,(2003)Recombinant Antibodies for Cancer Therapy,Vol.207,Methods in Molecular Biology pp 81-100)。特别优选的是DPK5、DPK4、DPK1、IGKV1-5*01、DPK24、DPK21和DPK15的框架区,分别与DPK9共享99、97、97、96、80、76、66%的同一性并且在这些共同结构特征中没有氨基酸差异。在一些方面,同一性%基于与VL的相似性,但不包括本文中定义为CDR的那些片段。

[0596] 抗体或其抗原结合片段可以含有包含人种系VH框架序列的VH框架。VH框架可以包含一个或多个氨基酸取代、添加或缺失,同时仍保持与其来源的种系的功能和结构相似性。在一些方面,VH框架与人种系VH框架序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同。在一些方面,抗体或其抗原结合片段包含VH框架,所述VH框架包含相对于人种系VH框架序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个氨基酸取代、添加或缺失。在一些方面,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代、添加或缺失仅在框架区中。在一些方面,同一性%基于与VH的相似性,但不包括本文中定义为CDR的那些片段。

[0597] 人种系VH框架可以是DP54或IGHV3-7的框架。人种系VH框架可以是DP47或IGHV3-23的框架。人种系VH框架可以是DP71或IGHV4-59的框架。人种系VH框架可以是DP75或IGHV1-2_02的框架。人种系VH框架可以是DP10或IGHV1-69的框架。人种系VH框架可以是DP7或IGHV1-46的框架。人种系VH框架可以是DP49或IGHV3-30的框架。人种系VH框架可以是DP51或IGHV3-48的框架。人种系VH框架可以是DP38或IGHV3-15的框架。人种系VH框架可以是DP79或IGHV4-39的框架。人种系VH框架可以是DP78或IGHV4-30-4的框架。人种系VH框架

可以是DP73或IGHV5-51的框架。人种系VH框架可以是DP50或IGHV3-33的框架。人种系VH框架可以是DP46或IGHV3-30-3的框架。人种系VH框架可以是DP31或IGHV3-9的框架。人种系VH框架可以是人VH种系共有序列的框架。人种系VH框架可以是人VH3种系共有序列的框架。人种系VH框架可以是人VH5种系共有序列的框架。人种系VH框架可以是人VH1种系共有序列的框架。人种系VH框架可以是人VH4种系共有序列的框架。

[0598] 在一些方面，VH框架是DP-54。还预测其他类似的框架区递送本发明的有利抗体，包含SEQ ID NO:7、8、9、11、19、20、21的CDR，和由以下VH氨基酸序列指定的CDR:6、10、12、17、18、36、38、40、52、53、54、55、56、57、63、96，包括DP-50、IGHV3-30*09、IGHV3-30*15、IGHV3-48*01、DP-77、DP-51、IGHV3-66*01、DP-53、DP-48、IGHV3-53*01、IGHV3-30*02和DP-49，其分别与DP-54的FW区包含93、92、92、99、97、97、96、96、94、94、93、92%的同一性，以及在共同结构特征中的一个或几个氨基酸差异(Kabat编号)(A) CDR的正下方的残基(游标区)、H2、H47、H48、和H49、H67、H69、H71、H73、H93、H94，(B) VH/VL链包装残基:H37、H39、H45、H47、H91、H93和(C) 规范CDR结构支持残基H24、H71、H94(参阅Lo 2004以及O'Brien和Jones 2003)。特别优选的是DP-50、IGHV3-30*09、IGHV3-30*15的框架区，分别与DP-54共享93、92和92%的同一性，并且在这些共同结构特征中没有氨基酸差异。在一些方面，同一性%基于与VH的相似性，但不包括本文中定义为CDR的那些片段。

[0599] 在某些实施方案中，本文描述的抗体或其抗原结合片段包含(i) 包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的氨基酸序列的VH，和/或(ii) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、至少60%、至少66%、至少70%、至少75%、至少76%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的氨基酸序列的VL。这些VL和VH序列的任何组合也包括在本发明中。

[0600] 在某些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段包含(i) 包含与SEQ ID NO:29至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的氨基酸序列的HC；和/或(ii) 包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少与91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的氨基酸序列的LC。这些HC和LC序列的任何组合也包括在本发明中。

[0601] 在某些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段包含Fc结构域。Fc结构域可以衍生自IgA(例如IgA₁或IgA₂)、IgG、IgE或IgG(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)。

[0602] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段，其与本文所述的任何一种抗体或其抗原结合片段，例如本文所提供的任何一种抗体(或其抗原结合片段)竞争与人CXCR5的结合。例如如果抗体或其抗原结合片段与人CXCR5的结合阻碍了随后CXCL13与人CXCR5的结合，则该抗体或其抗原结合片段与CXCL13竞争人CXCR5结合。

[0603] 本发明提供的抗体和抗原结合片段包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合抗体、双特异性抗体、杂合物抗体、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、结构域抗体(dAb)、人源化的抗体以及包含所需特异性

的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。抗体和抗原结合片段可以是鼠、大鼠、人或任何其他来源的(包括嵌合或人源化的抗体)。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是嵌合、人源化的或人抗体。在某些实施方案中,该抗体是人抗体。在某些实施方案中,抗体是人源化的抗体。

[0604] 表位作图

[0605] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其与本文所述的抗体或其抗原结合片段结合相同的人CXCR5表位。例如可以通过SPR、流式细胞术和本领域已知的任何其他测定法来评估抗体竞争测定法(和重叠的表位分析)。

[0606] 在一方面,本发明包括结合人CXCR5和食蟹猴CXCR5但不结合小鼠CXCR5的抗体或其抗原结合片段。

[0607] 本发明还包括结合人CXCR5的N末端区域(“N”)的抗体或其抗原结合片段。CXCR5的N末端包含根据SEQ ID NO:31的氨基酸序列编号的氨基酸残基编号1-51。

[0608] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其在包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基位置编号11处是亮氨酸(L)的表位上特异性结合CXCR5。

[0609] 在一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其在包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基位置编号22处是天冬氨酸(D)的表位上特异性结合CXCR5。

[0610] 在一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其在包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基位置编号11处是亮氨酸和在氨基酸残基位置编号22处是天冬氨酸的表位上特异性结合CXCR5。

[0611] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号11处的氨基酸残基是亮氨酸的CXCR5。

[0612] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号11处的氨基酸残基是亮氨酸的CXCR5,但不结合其中在位置编号11处的氨基酸残基是苏氨酸的CXCR5。

[0613] 在一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合野生型人CXCR5但不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基位置编号11处不是亮氨酸的CXCR5。

[0614] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号22处的氨基酸残基是天冬氨酸的CXCR5。

[0615] 在一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合野生型人CXCR5但不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号22处的氨基酸残基不是天冬氨酸的CXCR5。

[0616] 在一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合野生型人CXCR5但不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基位置编号22处是丙氨酸的CXCR5。

[0617] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号11处的氨基酸残基是亮氨酸和在位置编号22处的氨基酸残基是天冬氨酸的CXCR5。

[0618] 在一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合人CXCR5但不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号11处的氨基酸残基不是亮氨酸和在位置编号22处的氨基酸残基不是天冬氨酸的CXCR5。

[0619] 在一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合人CXCR5但不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号11处的氨基酸残基是苏氨酸和在位置编号22处的氨基酸残基是丙氨酸的CXCR5。

[0620] 根据本发明的教导,本领域技术人员将理解根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在位置编号11处和/或位置编号22处的氨基酸残基对于结合本发明的抗体至关重要。更具体而言,这些氨基酸残基对于抗体11G2或其抗原结合片段与CXCR5的结合至关重要。因此,本领域技术人员将理解本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合其中在位置11处的氨基酸残基是亮氨酸和在位置22处的氨基酸残基是天冬氨酸的CXCR5。这些氨基酸残基的取代或缺失可导致丧失与CXCR5的结合。在位置11处的氨基酸残基的某些取代可以保留结合,但不能用苏氨酸取代该(亮氨酸)氨基酸残基。类似地,在位置22处的氨基酸残基的某些取代或缺失可以保留结合,但不能用丙氨酸取代在该氨基酸残基编号的天冬氨酸。因此,11G2抗体或其抗原结合片段或者竞争与其结合的抗体的特征在于抗体结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号存在亮氨酸11和天冬氨酸22的人CXCR5,但是抗体不结合其中亮氨酸11被苏氨酸或另一个氨基酸残基取代,和其中抗体不结合其中天冬氨酸22被丙氨酸或另一个氨基酸残基取代。可以使用本领域中众所周知的多种方法来进行在氨基酸残基位置编号11处和/或编号22处的氨基酸取代后的结合丧失的测试,包括按照本文示例的方法使用点突变多肽的结合分析。

[0621] 基于本文提供的教导,本领域技术人员将理解本发明的抗体可以与例如11G2竞争,但不含包含根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基位置编号11处是亮氨酸和/或氨基酸残基位置编号22处是天冬氨酸的表位。换言之,抗体可以与本发明的抗体竞争结合CXCR5,但是当氨基酸残基编号11处是亮氨酸或氨基酸残基编号22处是天冬氨酸被不同的氨基酸取代时(例如苏氨酸替换亮氨酸和/或丙氨酸替换天冬氨酸),例如2C9、11A7和16D7,竞争抗体结合不受影响。因此,本发明的抗体竞争结合CXCR5,并且也不结合以下CXCR5:其中氨基酸残基编号11处不是亮氨酸,和更具体地,它是苏氨酸,和/或其中氨基酸残基编号22处不是天冬氨酸,和更具体地说,它是丙氨酸。如本文之前其他地方所述,突变CXCR5蛋白的产生和用于评估抗体竞争结合的测定法是本领域众所周知的,包括本文所述的那些方法。因此,基于本文提供的教导,本领域技术人员将能够容易地鉴定如下抗体:结合CXCR5,竞争与本发明的抗体的结合,并且失去结合其中某些氨基酸已被取代的CXCR5突变蛋白的能力,所述某些氨基酸例如亮氨酸11,天冬氨酸22或两者,均根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号。

[0622] 在另一方面,本发明包括与抗体11G2或其抗原结合片段竞争结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处不是亮氨酸的CXCR5。

[0623] 在另一方面,本发明包括与抗体11G2或其抗原结合片段竞争结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处不是天冬氨酸的CXCR5。

[0624] 在另一方面,本发明包括与抗体11G2或其抗原结合片段竞争结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处不是亮氨酸和在氨基酸残基编号22处不是天冬氨酸的CXCR5。

[0625] 在另一方面,本发明包括与抗体11G2或其抗原结合片段竞争结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是苏氨酸的CXCR5。

[0626] 在另一方面,本发明包括与抗体11G2或其抗原结合片段竞争结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号22处是丙氨酸的CXCR5。

[0627] 在另一方面,本发明包括与抗体11G2或其抗原结合片段竞争结合的抗体或其抗原结合片段,其中其中抗体不结合其中根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号在氨基酸残基编号11处是苏氨酸和在氨基酸残基编号22处是丙氨酸的CXCR5。

[0628] 抗CXCR5抗体的生物学活性

[0629] 除了结合CXCR5上的表位外,本发明的抗体或其抗原结合片段可以介导生物学活性。换言之,本发明包括分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5并介导选自以下的至少一种可检测的活性:(a)以高表观亲和力结合CXCR5+细胞,但不结合表达CXCR5小鼠、大鼠或兔直系同源物的细胞;(b)拮抗CXCL13对由毛喉素触发的cAMP释放的抑制作用;(c)触发人供体和食蟹猴PBMC和人供体TMC中表达CXCR5的细胞的ADCC;(d)结合人CXCR5但不结合人趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7或XCR1;(e)耗尽外周血和/或次级淋巴器官(即淋巴结、脾脏、派尔集合淋巴结和与黏膜相关的淋巴组织)中的B细胞;(f)耗尽外周血中的Tfh样细胞;(g)耗尽次级淋巴器官中的真正Tfh细胞;和(h)损害体液免疫记忆应答。

[0630] 在一方面,本发明包括抗体,或以高表观亲和力结合CXCR5+细胞,但不结合表达CXCR5小鼠、大鼠或兔直系同源物的细胞。可以使用流式细胞术来评估表观亲和力结合,以检测抗体与表达靶蛋白(例如CXCR5)的细胞的结合。可以用编码CXCR5的核酸瞬时或稳定地转染细胞。备选地,细胞可以是在其表面天然表达CXCR5的细胞。无论CXCR5+细胞的来源如何,均可使用多种本领域公认的方法轻松评估抗体与细胞的结合。抗体或其抗原结合片段结合人CXCR5或食蟹猴CXCR5,但未检测到结合或以小得多的程度结合小鼠、大鼠或兔CXCR5。

[0631] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5并拮抗由CXCL13与CXCR5结合介导的活性。有许多本领域已知的测定法来确定对由CXCR5-CXCL13信号传导介导的活性的抑制作用。一种这样的测定法是cAMP报告基因测定法。在这种测定法中,毛喉素诱导cAMP产生,其在稳定表达CXCR5的细胞中被CXCR5-CXCL13信号传导抑制。因此,通过测量在抗体存在或不存在下产生的cAMP的水平来评估抗CXCR5抗体结合CXCR5和拮抗CXCR5-CXCL13信号传导作用的能力。优选地,抗体可以介导cAMP水平的剂量依赖性增加,EC50是约50pM、约100pM、约200pM、约400pM、约600pM、约700pM、约750pM、约790pM、约800pM、约850pM、约900pM、约950pM、约960pM、约970pM、约980pM、约990pM或约1000pM。更优选地,抗体或其抗原结合片段以约961pM的EC50抑制CXCL13对由毛喉素触发的cAMP的抑制作用。

[0632] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5并触发人供体和食蟹猴 PBMC和人供体扁桃体单核细胞(TMC)中表达CXCR5的细胞的ADCC。许多ADCC测定法可以用于评估抗体的ADCC活性。本文在实施例6和7中描述了这样的一种示例性测定法,但是本发明不限于该特异性ADCC测定法。本发明包括对人B细胞、人Tfh样细胞、人Tfh细胞和食蟹猴B细胞表现出ADCC活性的抗体或其抗原结合片段,EC50是约0.11pM、0.2pM、0.5pM、1pM、1.5pM、2.0pM、2.5pM、3.0pM、4.5pM、4.8pM、5.0pM、6.0pM、7.0pM、8.0pM、9.0pM、10pM、11pM、12pM、15pM、20、pM、25pM、30pM、35pM或40pM。更优选地,抗体或其抗原结合片段表现出ADCC活性,具有对人B细胞的EC50为约 2.01 ± 2.28 pM,对人Tfh样细胞的EC50为约 4.82 ± 2.88 pM,对人Tfh细胞的EC50为约0.11pM,和对食蟹猴B细胞的EC50为约 15.3 ± 11.7 pM。甚至更优选地,抗体或其抗原结合片段是非岩藻糖基化的。

[0633] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其结合人CXCR5但未检测到结合人蛋白CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7或XCR1。

[0634] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5并表现出剂量依赖性耗尽外周血中的B细胞。耗尽可以是永久的,或更优选地,耗尽是瞬时的和/或可逆的。在一方面,足以介导B细胞耗尽的抗体剂量可以是在0.001至约0.2mg的范围内,其中0.0001mg/kg可介导食蟹猴外周血中B细胞和Tfh样细胞的耗尽与未施用抗体的外周血中B细胞或Tfh样细胞的百分比相比是约50%。另外,抗体可以介导以小于5mg/kg的剂量静脉内施用(IV)施用的食蟹猴的外周血中B细胞和Tfh样细胞的最大耗尽。优选地,在施用抗体后,B细胞、Tfh样和Tfh细胞部分或全部恢复。

[0635] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CXCR5并损害体液免疫记忆应答。在一方面,使用疫苗回忆测定法评估体液记忆应答。换言之,将抗体施用给已经预先用抗原例如破伤风类毒素(TT)免疫的受试者。给受试者第二次施用抗原,并将免疫应答例如IgM和IgG滴度与未施用抗体的其他相同受试者的免疫应答进行比较。一旦提供本文公开的教导,本领域技术人员将理解,确定体液记忆应答的许多测定法可以用于评估抗体或其抗原结合片段损害体液记忆应答的能力。此外,本领域技术人员将理解,损害体液记忆反应的能力是抗体或其抗原结合片段的理想特征,可用作治疗或预防有此需要的受试者的免疫疾病的疗法。

[0636] 本发明包括抗体或其抗原结合片段,其表现出上述所有生物活性中的至少一个,优选地两个,甚至更优选地三个,甚至更优选地四个,再更优选地五个,甚至更优选地六个,更优选地七种,和甚至更优选地全部。

[0637] III. 非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体

[0638] 在一个实施方案中,提供了具有碳水化合物结构的抗体,所述碳水化合物结构缺乏(直接或间接地)连接至Fc区的岩藻糖(即,非岩藻糖基化的抗体)。例如在包含大量这样的抗体的组合物中的岩藻糖的量可以是0%至约30%、0%至约20%、0%至约15%、0%至约10%、和更优选地0%至约5%。在一些实施方案中,包含大量这样的抗体的组合物包含至少80%,更优选地至少85%,还更优选地至少90%,甚至更优选地至少95%的非岩藻糖基化的抗体,再更优选地至少99%,和最优选地至少99.5%的非岩藻糖基化的抗体。在一些实施方案中,抗体是100%非岩藻糖基化的;换言之,使用本领域公认的检测抗体中岩藻糖的方法,

在Asn297未检测到岩藻糖。岩藻糖的量是通过计算糖链中在Asn297处的岩藻糖的平均量相对于与Asn 297连接的所有糖结构之和(例如复合、杂合和高甘露糖结构)来确定的。

[0639] 在一些实施方案中,岩藻糖基化的水平不超过0.5%,其基于测试方法的定量极限(LOQ)。因此,在一些实施方案中,非岩藻糖基化的水平大于或等于99.5%。N-连接的寡糖谱分析方法可以用于确定样品中岩藻糖基化、唾液酸化、甘露糖基化和末端糖基化的水平。N-连接寡糖方法可以用于评估N-连接的聚糖。简言之,用肽-N-糖苷酶F从蛋白质上酶促释放N-连接的聚糖。然后用荧光剂对聚糖进行衍生化,并使用亲水相互作用液相色谱和荧光检测进行分析。然后将色谱图与参考材料进行比较。该方法和许多其他方法在本领域中已知用于评估抗体的岩藻糖基化,并且可以用于确定本发明抗体中存在的岩藻糖基化的水平。

[0640] 检测抗体中岩藻糖的非限制性示例性方法包括MALDI-TOF质谱法(参见例如WO 2008/077546),释放的荧光标记的寡糖的HPLC测量(参见例如Schneider等人,“N-Glycan analysis of monoclonal antibodies and other glycoproteins using UHPLC with fluorescence detection,”Agilent Technologies, Inc. (2012); Lines, J. Pharm. Biomed. Analysis, 14:601-608 (1996); Takahasi, J. Chrom., 720:217-225 (1996)),毛细管电泳测量释放的荧光标记的寡糖(参见例如Ma等人, Anal. Chem., 71:5185-5192 (1999)),以及具有脉冲安培检测的HPLC以测量单糖组成(参见例如Hardy等人, Analytical Biochem., 170:54-62 (1988))。Asn297是指位于Fc区中约位置297的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于位置297上游或下游约+或-3个氨基酸,即在位置294和300之间。在本文所述的CXCR5抗体中,Asn297存在于序列QYNST中,并在表16中以粗体和加下划线标出(例如野生型人IgG1 Fc域的SEQ ID NO:31)。

[0641] 岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“非岩藻糖基化的”或“岩藻糖缺乏的”抗体有关的出版物的实例包括:US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki等J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki等Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。能够产生非岩藻糖基化的抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec 13CHO细胞(Ripka等人, Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)); 美国专利申请号US 2003/0157108 A1, Presta, L; 和WO 2004/056312, Adams等人, 尤其是实施例11), 和敲除细胞系, 例如缺少功能性 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8的细胞系, 例如敲除CHO细胞(参见, 例如Yamane-Ohnuki等人, Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y. 等人, Biotechnol. Bioeng, 94 (4) :680-688 (2006); 和WO2003/085107)。

[0642] 对抗体还提供了二等分的寡糖, 例如其中附着于抗体的Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。这样的抗体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体的实例描述于例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人); 美国专利号6,602,684 (Umaña等人); 和US 2005/0123546 (Umaña等人)中。还提供了在寡糖中具有附着至Fc区的至少一个半乳糖残基的抗体。这样的抗体可以具有改善的CDC功能。此类抗体描述于例如WO 1997/

30087 (Patel等人); WO 1998/58964 (Raju, S.); 和 WO 1999/22764 (Raju, S.)。

[0643] 在本发明的一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗体在人效应细胞存在下比包含岩藻糖的亲本抗体更有效地介导ADCC。通常,可以使用本文公开的体外ADCC测定法来确定ADCC活性,但是也考虑使用其他测定法或方法来确定ADCC活性,例如在动物模型中等。

[0644] 在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体在体外和/或体内具有增强的ADCC活性。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体在体外具有增强的ADCC活性。在一些实施方案中,通过本文描述的方法确定体外ADCC活性。简言之,将抗CXCR5抗体或同种型对照的系列稀释液与来自健康人供体或食蟹猴的外周血单核细胞(PBMC)进行温育。在该测定法中,PBMC是自然杀伤(NK)效应子细胞以及靶CXCR5+B和Tfh样细胞的来源。流式细胞术用于定量约20小时后剩余的B和Tfh样细胞的数量。通过将抗原结合群体的细胞毒性百分比相对于PF-06835375抗体浓度的对数进行作图来产生细胞毒性滴定曲线。使用**GraphPadPrism®** (6.0版, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) 非线性回归曲线拟合和激动剂剂量应答模型的S形对数,根据以下公式确定EC₅₀值:

[0645] $\text{Log}(\text{激动剂}) \text{ vs. 应答-可变斜率(四参数)}$

[0646] $Y = \text{底} + (\text{顶} - \text{底}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}})$

[0647] 其中Y是细胞毒性的百分比,X是抗体浓度,顶是对应于S型曲线的上平台的最大Y值,底是对应于S型曲线的下平台的最小Y值(限制为0),并且LogEC₅₀是曲线拐点处抗体浓度的对数。

[0648] 使用平均值和标准差(STDEV)总结了实验的EC₅₀值。在一些实施方案中,使用从扁桃体单核细胞分离的CD4+T细胞并添加从PBMC分离的NK细胞,类似地评估人源化的mAb诱导来自人扁桃体的真正Tfh细胞的ADCC的能力。在一些实施方案中,表达CXCR5的Ba/F3细胞用作靶细胞。在一些实施方案中,通过使用CytoTox非放射性细胞毒性测定法(Promega, Madison, WI) 定量LDH释放来确定细胞毒性。

[0649] 在一些实施方案中,使用5%的Triton X-100确定最大裂解,并且在不存在抗体的情况下确定自发释放。在一些实施方案中,可以使用下式确定特异性裂解的百分比:(实验-自发释放)/(最大-自发释放) × 100 = 特异性裂解百分比。在一些实施方案中,在至少一种受测抗体浓度,具有增强的ADCC活性的非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体导致特异性裂解比相同量的岩藻糖基化的抗体的特异性裂解高至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少60、至少65、至少70或至少75个百分点。在一些实施方案中,具有增强的ADCC活性的非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体导致特异性裂解比岩藻糖基化的抗体的特异性裂解高至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少60、至少65、至少70或至少75个百分点,其中每种抗体的浓度在0.01和1μg/ml之间,并且靶细胞是表达CXCR5的Ba/F3细胞。在一些实施方案中,以0.00005μg/ml至5μg/ml的浓度测试抗体。

[0650] 在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体对Fc γ RIIIA具有增强的亲和力。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体对Fc γ RIIIA (V158) 具有增强的亲和力。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体对Fc γ RIIIA (F158) 具有增强的亲和力。在一些实施方案中,使用表面等离子共振和/或如下来确定对Fc γ RIIIA的抗体亲和力,其参照Fc γ RIIIA (V158) 进行描述,但也适用于确定对Fc γ RIIIA (F158) 的亲和力。简言

之,在一些实施方案中,岩藻糖基化或非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体被捕获在蛋白A包被的葡聚糖芯片上。以各种浓度注射Fc γ R111A(V158)(可得自,例如R and D Systems)。Fc γ R111A(V158)对岩藻糖基化和非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体的缔合常数、解离常数和亲和力可以例如使用表面等离子共振系统(例如Biacore T200 Evaluation Software 1:1结合模型)附带的软件进行确定。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体可以对Fc γ R111A(例如Fc γ R111A(V158)或Fc γ R111A(F158))具有增强的亲和力,并且可以以是岩藻糖基化抗CXCR5抗体的至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少7倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍、至少17倍、20倍、30倍、50倍、100倍、500倍或至少1000倍的亲和力与Fc γ R111A结合。

[0651] IV. 抗CXCR5抗体表达与生产

[0652] 编码抗CXCR5抗体的核酸

[0653] 本发明还提供了编码任何抗体、包括本文所述的抗体片段和修饰的抗体的多核苷酸。本发明还提供了制备本文所述的任何多核苷酸的方法。可以通过本领域已知的方法制备和表达多核苷酸。

[0654] 可以使用标准测序技术确定所需抗体、确定的抗体片段或其抗原结合片段以及编码该抗体或其片段的核酸的序列。可以将编码所需抗体、确定的抗体片段或其抗原结合片段的核酸序列插入多种载体(例如克隆和表达载体)中,以进行重组生产和表征。可以将编码重链、确定的抗体片段或重链的抗原结合片段的核酸以及编码轻链、确定的抗体片段或轻链的抗原结合片段的核酸克隆到同一个或者不同的载体中。

[0655] 在一方面,本发明提供了编码以下任何CXCR5抗体及其抗原结合片段的氨基酸序列的多核苷酸:小鼠11G2 VH、小鼠11G2 VL、嵌合11G2 VH、嵌合11G2 VL、h11G2 VH(XC152)、h11G2 VH(XC155)、h11G2 VH(XC156)、h11G2 VH(XC157)、h11G2 VH(XC350)、h11G2 VH(XC351)、h11G2 VH(XC352)、h11G2 VH(XC353)、h11G2 VH(XC354)、h11G2 VL(XC151)、h11G2 VL(XC153)、h11G2 VL(XC154)、h11G2 VL(XC346)、h11G2 VL(XC347)、h11G2 VL(XC348)、h11G2 VL(XC349)、小鼠41A10 VH、小鼠41A10VL、嵌合41A10 VH、嵌合41A10 VL、人源化的41A10 VH(XC147)、h41A10 VH(XC148)、h41A10 VH(XC150)、h41A10 VL(XC142)、h41A10 VL(XC143)、h41A10 VL(XC144)、h41A10 VL(XC145)、h41A10 VL(XC146)、h41A10 VL(XC149)、小鼠5H7 VH、小鼠5H7 VL、嵌合5H7 VH和嵌合5H7 VL。编码上述氨基酸序列的多核苷酸编码与如本文所公开的本发明的抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0656] 本发明提供了编码氨基酸序列的多核苷酸抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合与选自以下的抗体基本相同的表位:嵌合41A10、人源化的41A10(142/147)、人源化的41A10(142/148)、嵌合11G2、非岩藻糖基嵌合11G2、人源化的11G2(151/152)、人源化的11G2(153/155)、人源化的11G2(153/156)、人源化的11G2(154/155)、人源化的11G2(154/157)和非岩藻糖基化的人源化的11G2(154/155)。

[0657] 本发明提供了编码抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列的多核苷酸,所述抗体或其抗原结合片段与选自以下的抗体竞争结合CXCR5:嵌合41A10、人源化的41A10(142/147)、人源化的41A10(142/148)、嵌合11G2、非岩藻糖基嵌合11G2、人源化的11G2(151/152)、人源化的11G2(153/155)、人源化的11G2(153/156)、人源化的11G2(154/155)、人源化的11G2

(154/157) 和非岩藻糖基人源化的11G2 (154/155)。

[0658] 本发明提供了编码一种或多种蛋白质的多核苷酸,所述蛋白质包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-29、SEQ ID NO:35-40和SEQ ID NO:47-63。

[0659] 本发明提供了包含SEQ ID NO:106、107、108和109中的一个或多个所示的核酸序列的多核苷酸。本发明提供了包含SEQ ID NO:95所示的核酸序列的多核苷酸。本发明提供了包含SEQ ID NO:96所示的核酸序列的多核苷酸。本发明提供了包含SEQ ID NO:97所示的核酸序列的多核苷酸。本发明提供了包含SEQ ID NO:98所示的核酸序列的多核苷酸。

[0660] 本发明提供了多核苷酸,包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323和保藏号PTA-124324的质粒的DNA插入物的核酸序列中的一个或两个。

[0661] 本发明提供了多核苷酸,包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124323的质粒中的插入物的核酸序列。

[0662] 本发明提供了多核苷酸,包含保藏在ATCC并具有保藏号PTA-124324的质粒中的插入物的核酸序列。

[0663] 本发明提供了多核苷酸,包含保藏在ATCC具有保藏号PTA-124323和保藏号PTA-124324的质粒的插入物的核酸序列。

[0664] 本发明提供了多核苷酸,包含保藏在ATCC具有保藏号PTA-124323的质粒的插入物的核酸序列。

[0665] 本发明提供了多核苷酸,包含保藏在ATCC具有保藏号PTA-124324的质粒的插入物的核酸序列。

[0666] 本发明提供了细胞,包含SEQ ID NO:106、107、108和109中一个或多个所示的一个或多个核酸分子。本发明提供了细胞,包含SEQ ID NO:106和107中所示的一个或多个核酸分子。本发明提供了包含SEQ ID NO:108和109中所示的一个或多个核酸分子的细胞。

[0667] 在另一方面,本发明提供了编码抗CXCR5抗体的多核苷酸及其变体,其中这样的变体多核苷酸与本文公开的任何特定核酸序列共享至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。这些量并不意味着是限制性的,并且所列举的百分比之间的增量被特别地考虑为本公开内容的一部分。

[0668] 本发明提供了由本文描述的核酸分子编码的多肽。

[0669] 在一个实施方案中,VH和VL结构域,或其抗原结合片段,或全长HC或LC由分开的多核苷酸编码。备选地,VH和VL两者,或其抗原结合片段,或HC和LC均由单个多核苷酸编码。

[0670] 与任何此类序列互补的多核苷酸也包括在本公开内容中。多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链,并且可以是DNA(基因组、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子包括含有内含子并以一对一方式对应于DNA分子的HnRNA分子和不含内含子的mRNA分子。另外的编码或非编码序列可以但不必存在于本公开内容的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但不必与其他分子和/或支持材料连接。

[0671] 多核苷酸可以包含天然序列(即,编码抗体或其部分的内源序列)或可以包含这种序列的变体。多核苷酸变体含有一个或多个取代、添加、缺失和/或插入,使得相对于天然免疫反应性分子,所编码的多肽的免疫反应性不降低。通常可以如本文所述评估对所编码的多肽的免疫反应性的影响。在一些实施方案中,变体与编码天然抗体或其部分的多核苷酸

序列表现出至少约70%的同一性,在一些实施方案中,至少约80%的同一性,在一些实施方案中,至少约90%的同一性,和在一些实施方案中,至少约95%的同一性。这些量并不意味着是限制性的,并且所列举的百分比之间的增量被特别地考虑为本公开内容的一部分。

[0672] 如果两个序列中的核苷酸或氨基酸序列如下所述以最大对应性比对时是相同的,则两个多核苷酸或多肽序列被认为“相同”。通常通过在比较窗口上比较序列以鉴定和比较序列相似性的局部区域来进行两个序列之间的比较。如本文所用的“比较窗口”是指至少约20个连续位置的片段,通常为30至约75或40至约50,其中可以将两个序列进行最佳比对后,将序列与相同数目的连续位置的参考序列进行比较。

[0673] 用于比较的序列的最佳比对可以使用默认参数,使用生物信息学软件 **Lasergene[®]** 试剂盒 (**DNASTAR[®]**, Inc., Madison, WI) 中的 **MegAlign[®]** 程序进行。该程序体现了以下参考文献中描述的几种比对方案: Dayhoff, M. O., 1978, A model of evolutionary change in proteins—Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345–358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626–645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. 和 Sharp, P. M., 1989, CABIOS 5: 151–153; Myers, E. W. 和 Muller W., 1988, CABIOS 4: 11–17; Robinson, E. D., 1971, Comb. Theor. 11: 105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4: 406–425; Sneath, P. H. A. 和 Sokal, R. R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. 和 Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 726–730。

[0674] 在一些实施方案中,通过在至少20个位置的比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性的百分比”,其中在比较窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分与用于两个序列的最佳比对的参考序列(不包含添加或缺失)相比,可以包括添加或缺失(即缺口)为20%或更少,通常为5至15%,或10至12%。通过确定在两个序列中相同核酸碱基或氨基酸残基出现的位置数以产生匹配位置数,将匹配位置数除以参考序列中的位置总数(即窗口大小),然后将结果乘以100,来计算百分比,即可得出序列同一性的百分比。

[0675] 变体也可以或可替代地与天然基因或者其部分或补体基本上同源。这样的多核苷酸变体能够在中等严格条件下与编码天然抗体的天然存在的DNA序列(或互补序列)杂交。

[0676] 合适的“中等严格条件”包括在5X SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0) 的溶液中预洗涤;在50°C–65°C, 5X SSC中杂交过夜;然后在65°C用含0.1% SDS的各2X、0.5X和0.2X SSC分别洗涤两次,持续20分钟。

[0677] 如本文所用,“高严格条件”或“高严格性条件”是:(1) 采用低离子强度和高温进行洗涤,例如在50°C的0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠;(2) 在杂交过程中使用变性剂,例如甲酰胺,例如在42°C的50% (v/v) 甲酰胺与0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液pH 6.5和750mM氯化钠、75mM柠檬酸钠;或(3) 在42°C使用50%甲酰胺、5X SSC (0.75M NaCl, 0.075M柠檬酸钠)、50mM磷酸钠 (pH 6.8)、0.1%焦磷酸钠、5X Denhardt溶液、超声处理的鲑鱼精子DNA (50μg/mL)、0.1% SDS和10%硫酸右旋糖酐,在42°C在0.2X SSC (氯化钠/柠檬酸钠) 和在55°C的50%甲酰胺中

洗涤,然后进行高严格性洗涤,包括在55℃含EDTA的0.1X SSC。本领域技术人员将认识到如何根据需要调节温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0678] 本领域普通技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,存在编码如本文所述的多肽的许多核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性。但是,本公开内容特别考虑了由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸。此外,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因在本公开内容的范围内。等位基因是由于一种或多种突变(例如核苷酸的缺失、添加和/或取代)而改变的内源基因。所得的mRNA和蛋白质可以但不必具有改变的结构或功能。可以使用标准技术(例如杂交、扩增和/或数据库序列比较)鉴定等位基因。

[0679] 可以使用化学合成、重组方法或PCR获得本公开内容的多核苷酸。化学多核苷酸合成的方法在本领域中是众所周知的,并在此无需详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业DNA合成仪以产生所需的DNA序列。

[0680] 为了使用重组方法制备多核苷酸,可以将包含所需序列的多核苷酸插入合适的载体中,然后将该载体引入合适的宿主细胞中进行复制和扩增,如本文进一步讨论的。可以通过本领域已知的任何方式将多核苷酸插入宿主细胞。通过直接摄取、内吞、转染、F-杂交或电穿孔而引入外源多核苷酸来转化细胞。一旦引入,外源多核苷酸可以作为非整合载体(例如质粒)或整合到宿主细胞基因组中而维持在细胞内。如此扩增的多核苷酸可以通过本领域熟知的方法从宿主细胞中分离。参见例如Sambrook等人,1989。

[0681] 备选地,PCR允许DNA序列的复制。PCR技术是本领域公知的,并描述在美国专利号4,683,195、4,800,159、4,754,065和4,683,202,以及PCR:The Polymerase Chain Reaction,Mullis等人eds.,Birkauser Press,Boston,1994中。

[0682] 可以通过在合适的载体中使用分离的DNA并将其插入合适的宿主细胞中来获得RNA。当细胞复制并且DNA被转录成RNA时,然后可以使用本领域技术人员众所周知的方法分离RNA,例如如Sambrook等人,1989中所述。

[0683] 在一些实施方案中,第一载体包含编码重链的多核苷酸,第二载体包含编码轻链的多核苷酸。在一些实施方案中,将第一载体和第二载体以相似的量(例如相似的摩尔量或相似的质量量)转染到宿主细胞中。在一些实施方案中,将第一载体和第二载体的5:1至1:5之间的摩尔比或质量比转染到宿主细胞中。在一些实施方案中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用1:1至1:5的质量比。在一些实施例中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用1:2的质量比。

[0684] 载体

[0685] 在一些实施方案中,选择针对在CHO或CHO来源的细胞或在NS0细胞中表达多肽而优化的载体。此类载体的示例描述于例如Running Deer等人,Biotechnol.Prog.20:880-889(2004)中。

[0686] 合适的克隆和表达载体可以包括多种组分,例如启动子、增强子和其他转录调节序列。也可以构建载体以允许将抗体可变结构域随后克隆到不同的载体中。合适的克隆载体可以根据标准技术构建,或者可以选自本领域中可获得的大量克隆载体。虽然选择的克隆载体可以根据打算使用的宿主细胞而有所不同,但有用的克隆载体通常具有自我复制的能力,可以具有特定限制性核酸内切酶的单一靶标和/或可以携带可以用于选择包含载体

的克隆的标志物的基因。合适的实例包括质粒和细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript (例如pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA和穿梭载体例如pSA3和pAT28。这些和许多其他克隆载体可从商业供应商例如BioRad、Stratagene和Invitrogen处获得。还提供了表达载体。表达载体通常是可复制的多核苷酸构建体,其含有根据本公开内容的多核苷酸。暗示表达载体必须作为附加体或作为染色体DNA的整合部分而在宿主细胞中可复制。合适的表达载体包括但不限于质粒,病毒载体包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒,粘粒和PCT公开号W087/04462中公开的表达载体。载体组分通常可以包括但不限于以下的一种或多种:信号序列;复制的起点;一种或多种标志物基因;合适的转录控制元件(例如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即翻译),通常还需要一个或多个翻译控制元件,例如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0687] 含有目的多核苷酸和/或多核苷酸本身的载体可以通过许多合适的方式中的任何一种引入宿主细胞,包括电穿孔,使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质的转染;微粒轰击;脂质转染;和感染(例如当载体是传染因子,如牛痘病毒时)。引入载体或多核苷酸的选择通常将取决于宿主细胞的特征。

[0688] 宿主细胞

[0689] 可以使用合适的宿主细胞重组制备抗体或其抗原结合片段。可以将编码抗体或其抗原结合片段的核酸克隆到表达载体中,然后将其引入宿主细胞,例如大肠杆菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,其中细胞不以其他方式产生免疫球蛋白,从而在重组宿主细胞中获得抗体的合成。在本领域公知的许多细胞中,优选的宿主细胞包括CHO细胞、人胚肾HEK-293细胞或Sp2.0细胞等许多本领域众所周知的细胞。可以通过蛋白水解或其他降解全长抗体、通过重组方法或通过化学合成来产生抗体片段。抗体的多肽片段,特别是多至约50个氨基酸的较短的多肽,可以通过化学合成方便地制备。用于蛋白质和肽的化学合成方法是本领域已知的并且可商购。

[0690] 在各种实施方案中,抗CXCR5重链和/或抗CXCR5轻链可以表达在原核细胞如细菌细胞中;或在真核细胞如真菌细胞(例如酵母)、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞中。这种表达可以例如根据本领域已知的方法进行。可用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;和293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S、DG44、Lec13 CHO细胞和FUT8 CHO细胞;**PER.C6®**细胞(Crucell);和NS0细胞。在一些实施方案中,抗CXCR5重链和/或抗CXCR5轻链可以在酵母中表达。参见例如美国公开号US2006/0270045A1。在一些实施方案中,基于其对抗CXCR5重链和/或抗CXCR5轻链进行所需的翻译后修饰的能力来进行选择特定的真核宿主细胞。例如在一些实施方案中,CHO细胞产生的多肽具有在293细胞中产生的相同多肽更高水平的唾液酸化程度。

[0691] 可以通过任何方法完成将一种或多种核酸引入所需的宿主细胞,包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等。非限制性示例性方法描述于例如Sambrook等人,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)。可以根据任何合适的方法在所需的宿主细胞中瞬时或稳定地转染核酸。

[0692] 在一些实施方案中,在能够产生非岩藻糖基化的抗体的细胞,例如缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec3 CHO细胞中产生非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体(Ripka等人,

Arch.Biochem.Biophys.249:533-545 (1986);美国专利申请号US 2003/0157108;和WO 2004/056312,特别是实施例11),以及敲除细胞系,例如缺少功能性 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8的细胞系,例如敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614 (2004);Kanda等人,Biotechnol.Bioeng,94 (4):680-688 (2006);和WO2003/085107)。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体在缺乏功能性FUT8基因的CHO细胞中产生。在一些实施方案中,非岩藻糖基化的抗CXCR5抗体在**Potelligent®**CHOK1SV细胞(BioWa/Lonza,Allendale,NJ)中产生。

[0693] 抗CXCR5抗体可以通过任何合适的方法纯化。此类方法包括但不限于使用亲和基质或疏水相互作用色谱法。合适的亲和配体包括CXCR5 ECD和结合抗体恒定区的配体。例如蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或抗体亲和柱可用于结合恒定区并纯化抗CXCR5抗体。疏水相互作用色谱法,例如丁基或苯基柱,也可以适用于纯化一些多肽。纯化多肽的许多方法是本领域已知的。

[0694] 在一些实施方案中,在无细胞系统中产生抗CXCR5抗体。非限制性示例性无细胞系统描述于例如Sitaraman等人,Methods Mol.Biol.498:229-44 (2009);Spirin,Trends Biotechnol.22:538-45 (2004);Endo等人,Biotechnol.Adv.21:695-713 (2003)。

[0695] V.用途和医学疗法

[0696] 在一些方面,本公开提供了使用抗CXCR5抗体或其抗原结合片段来去除、抑制或降低CXCR5活性或信号传导的治疗方法,其中治疗方法包括施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含抗CXCR5抗体或其抗原结合片段。所治疗的病症是通过去除、抑制或降低CXCR5活性或信号传导而得到改善、缓解、抑制或预防的任何疾病或病况。

[0697] 在一些方面,本公开提供了抗CXCR5抗体或其抗原结合片段,其用于去除、抑制或降低CXCR5活性或信号传导。在一些实施方案中,用途可以包括施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含抗CXCR5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抑制或降低CXCR5活性或信号传导可以治疗通过去除、抑制或降低CXCR5活性或信号传导而得到改善、缓解、抑制或预防的任何疾病或病况。

[0698] 此类疾病、病症或病况包括但不限于炎性反应,例如系统性红斑狼疮(SLE);慢性炎性反应;动脉粥样硬化;白细胞粘附不足;类风湿关节炎;糖尿病(例如I型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化症;雷诺综合征;自身免疫性甲状腺炎;过敏性脑脊髓炎;干燥综合征;幼发型糖尿病;和与由结核、结节病、多发性肌炎、肉芽肿病和血管炎中常见的细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏有关的免疫应答;韦格纳病;恶性贫血(阿迪森氏病);涉及白细胞渗出的疾病;中枢神经系统(CNS)炎性疾病;多器官损伤综合征;溶血性贫血(包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯阳性贫血);重症肌无力;抗原-抗体复合物介导的疾病;抗肾小球基底膜病;抗磷脂综合征;过敏性神经炎;格雷夫斯病;兰伯特-伊顿肌无力综合征;天疱疮性大疱;天疱疮;自身免疫多发性内分泌病;白癜风;瑞特氏病;僵人综合征;白塞病;巨细胞动脉炎;免疫复合物肾炎;IgA肾病;IgM多发性神经病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症和自身免疫性溶血性疾病;桥本甲状腺炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性血友病;自身免疫性淋巴组织增生综合征(ALPS);自身免疫性葡萄膜视网膜炎;吉兰-巴雷综合征;肺出血-肾炎综合征;混合性结缔组织病;自身免疫性相关不育;结节性多发性动脉炎;斑秃;特发性粘液水肿;移植物抗宿主病;肌肉营养不良

(Duchenne、Becker、强直性、肢带、面肩肱、先天性、眼咽、远端、Emery–Dreifuss)，和控制表达CXCR5的癌细胞的增殖，例如胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、T细胞白血病和B细胞白血病，如本领域技术人员根据本文公开的教导所理解的。

[0699] 本发明的抗CXCR5抗体或其抗原结合片段也可以用于检测和/或测量样品中的CXCR5或表达CXCR5的细胞，例如用于诊断目的。例如抗CXCR5抗体或其片段可以用于诊断以CXCR5的异常表达(例如过表达、表达不足、缺乏表达等)为特征的病症或病况。CXCR5的示例性诊断测定法可以包括例如使从患者获得的样品与本发明的抗CXCR5抗体接触，其中抗CXCR5抗体用可检测的标记或报告分子进行标记。

[0700] 如本文所用，“药学上可接受的运载体”或“药学上可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时允许该成分保留生物学活性并且与受试者的免疫系统不反应的任何材料。实例包括但不限于任何标准药物运载体，例如磷酸盐缓冲盐溶液，水，乳液例如油/水乳液和多种类型的润湿剂。用于气雾剂或肠胃外给药的优选稀释剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)或生理盐水(0.9%)。通过众所周知的常规方法配制包含此类载体的组合物(参见例如Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 和Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing, 2000)。

[0701] VI. 组合物

[0702] 本公开内容还提供了包含有效量的本文所述的CXCR5抗体或其抗原结合片段的药物组合物。本文还描述了此类组合物以及如何配制的实例。在一些实施方案中，组合物包含一种或多种CXCR5抗体。在其他实施方案中，CXCR5抗体识别CXCR5。在其他实施方案中，CXCR5抗体是人抗体。在其他实施方案中，CXCR5抗体是人源化的抗体。在一些实施方案中，CXCR5抗体包含能够触发所需免疫应答的恒定区，例如抗体介导的裂解或ADCC。在其他实施方案中，CXCR5抗体包含是非岩藻糖基化的恒定区并提供与岩藻糖基化的其他方面相同的抗体相比增强的ADCC。在其他实施方案中，CXCR5抗体包含抗体的一个或多个CDR(例如一个、两个、三个、四个、五个，或者在一些实施方案中，所有六个CDR)。

[0703] 应理解，组合物可以包含超过一种CXCR5抗体或其抗原结合片段(例如识别CXCR5的不同表位的CXCR5抗体的混合物)。其他示例性组合物包含识别相同的表位的超过一种CXCR5抗体，或与CXCR5的不同表位结合的不同种类的CXCR5抗体。在一些实施方案中，组合物包含识别CXCR5的不同变体的CXCR5抗体的混合物。

[0704] 用于本公开内容的组合物可以进一步包含以冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂(Remington: The Science and practice of Pharmacy 20th Ed., 2000, Lippincott Williams和Wilkins, Ed. K.E. Hoover)。可接受的运载体、赋形剂或稳定剂在剂量和浓度下对受体无毒，并且可以包含缓冲剂，例如磷酸、柠檬酸和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲基氯化铵；苯扎氯铵，苄索氯铵；苯酚，丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸烷基酯，例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；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，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或右旋糖酐；螯合剂，例如EDTA；糖，例如蔗糖、

甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐的抗衡离子，例如钠离子；金属络合物（例如锌蛋白络合物）；和/或非离子表面活性剂，例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇（PEG）。本文进一步描述了药学上可接受的赋形剂。

[0705] CXCR5抗体、其抗原结合片段及其组合物也可以与用于增强和/或补充试剂效力的其他试剂组合使用。

[0706] 在某些实施方案中，在施用前，将CXCR5抗体或其抗原结合片段与CXCR5复合。在某些实施方案中，在施用前，不将CXCR5抗体与CXCR5复合。

[0707] 本公开内容还提供了组合物，包括药物组合物，其包含本公开内容的任何多核苷酸。在一些实施方案中，组合物包含表达载体，所述表达载体包含编码如本文所述的抗体的多核苷酸。在其他实施方案中，组合物包含表达载体，所述表达载体包含编码本文所述的任何抗体的多核苷酸。在其他实施方案中，组合物包含编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:6所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:10所示序列的多核苷酸一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:12所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:10所示序列的多核苷酸的一个或两个，编码SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:12所示序列的多核苷酸的一个或两个，编码SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:17所示序列的多核苷酸的一个或两个，编码SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:18所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:63所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:52所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:53所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:54所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:55所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:56所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:57所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:48所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:49所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:50所示序列的多核苷酸中的一个或两个，或编码SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:51所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:58所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:59所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:60所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:61所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:62所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:1所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:5所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:47所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:48所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:49所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:50所示序列的多核苷酸中的一个或两个，编码SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:51所示序列的多核苷酸中的一个或两个，或编码SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36所示序列的多核苷酸中的一个或两个。

[0708] 在另一方面，多核苷酸可以编码本公开内容的抗体的VH、VL和/或VH和VL二者。换言之，组合物包含编码本公开内容的抗体或其抗原结合片段的单个多核苷酸或超过一个多

核苷酸。

[0709] 本公开内容的药物组合物也可以在组合疗法中例如与其他药剂组合施用。例如组合疗法可以包括本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段与至少一种其他疗法组合,其他疗法可以是手术、免疫疗法或药物疗法。

[0710] 本公开内容的药物化合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。这种盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸的那些,例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等,以及衍生自无毒有机酸的那些,例如脂族一元和二元羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等。碱加成盐包括衍生自碱土金属(如钠、钾、镁、钙等)的那些,以及衍生自无毒有机胺(如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等)的那些。

[0711] 本公开内容的药物组合物还可以包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化的羟基茴香醚(BHA)、丁基化的羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0712] 可用于本公开内容的药物组合物中的合适的水性和非水性运载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣材料,在分散体的情况下通过维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0713] 这些组合物还可含有佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以通过灭菌程序并通过包括各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保防止微生物的存在。还可能需要在组合物中包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。另外,可通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0714] 药物组合物通常必须在生产和储存条件下是无菌的和稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。运载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣,在分散液的情况下通过维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,在组合物中包括等渗剂是合适的,等渗剂例如糖,多元醇如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸盐和明胶来延长可注射组合物的吸收。

[0715] 无菌可注射溶液可以通过如所需的,将所需量的活性化合物与以上列举的成分中的一种或组合掺入合适的溶剂中,然后进行灭菌微滤来制备。

[0716] 通常,通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基本分散介质和所需的上文列举的其他成分。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0717] 本公开内容的药物组合物可以以适于眼科施用的制剂制备、包装或出售。这样的制剂可以例如是滴眼剂的形式,包括例如活性成分在水性或油性液体运载体中的0.1%-1.0% (w/w) 溶液或悬浮液。这样的滴剂可进一步包含本文所述的其他成分中的一种或多

种、缓冲剂或盐。其他有用的眼科施用制剂包括那些包含微晶形式或脂质体制剂中的活性成分的制剂。

[0718] 本文所用的“其他成分”包括但不限于以下一种或多种：赋形剂；表面活性剂；分散剂；惰性稀释剂；制粒和崩解剂；粘合剂；润滑剂；甜味剂；调味剂；着色剂；防腐剂；生理可降解的组合物例如明胶；水性媒介物和溶剂；油性媒介物和溶剂；悬浮剂；分散剂或湿润剂；乳化剂，缓和剂；缓冲剂；盐；增稠剂；填充剂；乳化剂；抗氧化剂；抗生素；抗真菌剂；稳定剂；和药学上可接受的聚合或疏水材料。可以包括在本公开内容的药物组合物中的另外的“其他成分”是本领域已知的并且描述在例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1985) 中，其通过引用并入本文。

[0719] 在一个实施方案中，CXCR5抗体或其抗原结合片段以含有5mg/mL，或在一些实施方案中约10mg/mL，或在一些实施方案中15mg/mL，或在一些实施方案中约20mg/mL，或在一些实施方案中约25mg/mL，或在一些实施方案中约50mg/mL的抗体与乙酸钠、聚山梨酯80和氯化钠的约5至6的pH范围内的无菌水溶液的静脉内制剂形式施用。在一些实施方案中，静脉内制剂是含有5或10mg/mL的抗体与20mM乙酸钠、0.2mg/mL聚山梨酯80和140mM氯化钠的pH 5.5的无菌水溶液。此外，包含抗体或其抗原结合片段的溶液可以包含除许多其他化合物外的组氨酸、甘露醇、蔗糖、海藻糖、甘氨酸、聚乙二醇、EDTA、甲硫氨酸及其任意组合，以及许多相关领域中已知的其他化合物。

[0720] 在一个实施方案中，本公开内容的药物组合物包含以下组分：50mg/mL本公开内容的CXCR5抗体或抗原结合片段、20mM组氨酸、8.5%蔗糖和0.02%聚山梨酯80，0.005%EDTA，pH 5.8；在另一个实施方案中，本发明的药物组合物包含以下组分：100mg/mL本公开内容的CXCR5抗体或抗原结合片段、10mM组氨酸、5%蔗糖和0.01%的聚山梨酯80，pH 5.8。该组合物可以以液体制剂或冻干粉的形式提供。当粉末以最大体积重构时，组合物保留相同的配方。备选地，可以将粉末以一半体积重构，在这种情况下，组合物包含100mg本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段、20mM组氨酸、10%蔗糖和0.02%聚山梨酯80，pH 5.8。

[0721] 在一个实施方案中，部分剂量通过静脉内推注施用，而其余剂量通过输注抗体制剂施用。例如可以推注施用0.01mg/kg静脉内注射的CXCR5抗体或其抗原结合片段，而其余抗体剂量可以通过静脉内注射施用。预定剂量的CXCR5抗体或其抗原结合片段可以例如在一个半小时至两个小时至五个小时的时间内施用。

[0722] 关于治疗剂，其中所述治疗剂是例如小分子，其可以以生理上可接受的酯或盐的形式存在于药物组合物中，例如与生理上可接受的阳离子或阴离子组合，如本领域中众所周知的。

[0723] 本文描述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。通常，这样的制备方法包括以下步骤：使活性成分与运载体或一种或多种其他辅助成分结合，然后，如果必要或需要，将产品成形或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

[0724] 在一个实施方案中，本发明的组合物是无热原的制剂，其基本上不含内毒素和/或相关的热原性物质。内毒素包括被限制在微生物内部并在微生物分解或死亡时释放的毒素。热原物质还包括来自细菌和其他微生物外膜的诱发发热的热稳定物质(糖蛋白)。如果对人施用，这两种物质都会引起发烧、低血压和休克。由于潜在的有害作用，从静脉内施用的药学药物溶液中去掉至少量的内毒素是有利的。美国食品药品监督管理局(“FDA”)设定了

静脉内药物施用的一个小时内每剂量每千克体重5个内毒素单位(EU)的上限(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1):223(2000))。当以每千克体重几百或几千毫克的量施用治疗性蛋白质时,去除甚至痕量的内毒素是有利的。在一个实施方案中,组合物中内毒素和热原的水平小于10EU/mg,或小于5EU/mg,或小于1EU/mg,或小于0.1EU/mg,或小于0.01EU/mg,或小于0.001EU/mg。在另一个实施方案中,组合物中内毒素和热原水平小于约10EU/mg,或小于约5EU/mg,或小于约1EU/mg,或小于约0.1EU/mg,约0.01EU/mg,或小于约0.001EU/mg。

[0725] 在一个实施方案中,本公开内容包括施用组合物,其中所述施用是口服、肠胃外、肌内、鼻内、阴道、直肠、舌、舌下、颊、颊内、静脉内、皮肤、皮下或透皮。

[0726] 在另一个实施方案中,本公开内容还包括与其他疗法例如手术、化学疗法、激素疗法、生物疗法、免疫疗法或放射疗法组合施用组合物。

[0727] VII. 给药/施用

[0728] 为了制备包括本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段的药物或无菌组合物,将抗体与药学上可接受的运载体或赋形剂混合。治疗剂和诊断剂的制剂可以通过与生理上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂混合而制备,以例如冻干粉剂、浆剂、水溶液、洗剂或混悬剂的形式(参见例如Hardman等人(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams and Wilkins, New York, N.Y.; Avis等人(eds.)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman等人(eds.)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman等人(eds.)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner和Kotkoskie(2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.)。

[0729] 选择用于治疗剂的施用方案取决于几个因素,包括实体的血清或组织更新率、症状的水平、实体的免疫原性以及生物基质中靶细胞的可及性。在某些实施方案中,施用方案与副作用的可接受水平一致地最大化了递送给患者的治疗剂的量。因此,所递送的生物制剂的量部分取决于特定实体和所治疗病况的严重性。可获得选择合适剂量的抗体、细胞因子和小分子的指南(参见例如Wawrzynczak, 1996, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina(ed.), 1991, Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach(ed.), 1993, Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert等人, 2003, New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom等人, 1999, New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon等人, 2001, New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz等人, 2000, New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh等人, 2003, New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky等人, 2000, New Engl. J. Med. 343:1594-1602)。

[0730] 临床医生例如使用本领域已知或怀疑影响治疗或预计影响治疗的参数或因素来确定合适的剂量。通常,剂量以比最佳剂量稍小的量开始,然后以小增量增加,直到相对于任何负面副作用达到期望或最佳效果为止。重要的诊断量度包括那些症状,例如炎症或产生的炎性细胞因子的水平。

[0731] 可以改变本公开内容的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以获得对于特定患者、组合物和施用方式有效达到期望的治疗应答,而对患者无毒的活性成分的量。选择的剂量水平将取决于各种药代动力学因素,包括所用本公开内容的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,所用特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间,与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康状况和既往病史,以及医学领域众所周知的类似因素。

[0732] 包含本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段的组合物可以通过连续输注或通过以例如间隔一天、一周或每周1-7次的剂量来提供。剂量可以通过静脉内、皮下、局部、口服、经鼻、直肠、肌内、脑内或通过吸入提供。特定剂量方案是一种涉及最大剂量或剂量频率的方案,可以避免明显的不利副作用。每周总剂量可以是至少0.05 μ g/kg体重、至少0.2 μ g/kg、至少0.5 μ g/kg、至少1 μ g/kg、至少10 μ g/kg、至少100 μ g/kg、至少0.2mg/kg、至少1.0mg/kg、至少2.0mg/kg、至少10mg/kg、至少15mg/kg、至少20mg/kg、至少25mg/kg或至少50mg/kg(例如参见Yang等人,2003,New Engl.J.Med.349:427-434;Herold等人,2002,New Engl.J.Med.346:1692-1698;Liu等人,1999,J.Neurol.Neurosurg.Psych.67:451-456;Portielji等人,2003,Cancer.Immunol.Immunother.52:133-144)。剂量可以是至少15 μ g、至少20 μ g、至少25 μ g、至少30 μ g、至少35 μ g、至少40 μ g、至少45 μ g、至少50 μ g、至少55 μ g、至少60 μ g、至少65 μ g、至少70 μ g、至少75 μ g、至少80 μ g、至少85 μ g、至少90 μ g、至少95 μ g或至少100 μ g。施用给受试者的剂量可为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12或更多的数。

[0733] 对于本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段,施用给患者的剂量可以是0.0001mg/kg至100mg/kg患者体重。剂量可以是0.0001mg/kg至20mg/kg、0.0001mg/kg至10mg/kg、0.0001mg/kg至5mg/kg、0.0001至2mg/kg、0.0001至1mg/kg、0.0001mg/kg至0.75mg/kg、0.0001mg/kg至0.5mg/kg、0.0001mg/kg至0.25mg/kg、0.0001至0.15mg/kg、0.0001至0.10mg/kg、0.001至0.5mg/kg、0.01至0.25mg/kg或0.01至0.10mg/kg患者体重。

[0734] CXCR5抗体或其抗原结合片段的剂量可以使用患者的体重(kg)乘以待施用一剂量(mg/kg)来计算。本公开内容的抗体的剂量可以是150 μ g/kg或更少、125 μ g/kg或更少、100 μ g/kg或更少、95 μ g/kg或更少、90 μ g/kg或更少、85 μ g/kg或更少、80 μ g/kg或更少、75 μ g/kg或更少、70 μ g/kg或更少、65 μ g/kg或更少、60 μ g/kg或更少、55 μ g/kg或更少、50 μ g/kg或更少、45 μ g/kg或更少、40 μ g/kg或更少、35 μ g/kg或更少、30 μ g/kg或更少、25 μ g/kg或更少、20 μ g/kg或更少、15 μ g/kg或更少、10 μ g/kg或更少、5 μ g/kg或更少、2.5 μ g/kg或更少、2 μ g/kg或更少、1.5 μ g/kg或更少、1 μ g/kg或更少、0.5 μ g/kg或更少、或者0.1 μ g/kg或更少的病人体重。

[0735] 本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段的单位剂量可以是0.1mg至200mg、0.1mg至175mg、0.1mg至150mg、0.1mg至125mg、0.1mg至100mg、0.1mg至75mg、0.1mg至50mg、0.1mg至30mg、0.1mg至20mg、0.1mg至15mg、0.1mg至12mg、0.1mg至10mg、0.1mg至8mg、0.1mg至7mg、0.1mg至5mg、0.1至2.5mg、0.25mg至20mg、0.25至15mg、0.25至12mg、0.25至10mg、0.25至8mg、0.25mg至7mg、0.25mg至5mg、0.5mg至2.5mg、1mg至20mg、1mg至15mg、1mg至12mg、1mg至10mg、1mg至8mg、1mg至7mg、1mg至5mg或1mg至2.5mg。

[0736] 本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段的剂量可以达到受试者中的血清滴度是至少0.1 μ g/mL、至少0.5 μ g/mL、至少1 μ g/mL、至少2 μ g/mL、至少5 μ g/mL、至少6 μ g/mL、至少10 μ g/mL、至少15 μ g/mL、至少20 μ g/mL、至少25 μ g/mL、至少50 μ g/mL、至少100 μ g/mL、至少125 μ

g/mL、至少150 μ g/mL、至少175 μ g/mL、至少200 μ g/mL、至少225 μ g/mL、至少250 μ g/mL、至少275 μ g/mL、至少300 μ g/mL、至少325 μ g/mL、至少350 μ g/mL、至少375 μ g/mL或至少400 μ g/mL。备选地,本公开内容的抗体的剂量可以达到受试者中的血清滴度是至少0.1 μ g/mL、至少0.5 μ g/mL、至少1 μ g/mL、至少2 μ g/mL、至少5 μ g/mL、至少6 μ g/mL、至少10 μ g/mL、至少15 μ g/mL、至少20 μ g/mL、至少25 μ g/mL、至少50 μ g/mL、至少100 μ g/mL、至少125 μ g/mL、至少150 μ g/mL、至少175 μ g/mL、至少200 μ g/mL、至少225 μ g/mL、至少250 μ g/mL、至少275 μ g/mL、至少300 μ g/mL、至少325 μ g/mL、至少350 μ g/mL、至少375 μ g/mL或至少400 μ g/mL。

[0737] 可以重复本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段的剂量并且可以将施用分开至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2个月、75天、3个月或至少6个月。

[0738] 对于特定患者的有效量可以根据诸如在治疗中的病况、患者的整体健康状况、方法途径和施用剂量以及副作用的严重性等因素而变化(参见例如Maynard等人,1996,A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice,Interpharm Press,Boca Raton,FLa.; Dent,2001,Good Laboratory and Good Clinical Practice,Urch Publ,London,UK)。

[0739] 施用途径可以是通过例如局部或皮肤应用,通过静脉内、腹膜内、脑内、肌内、眼内、动脉内、脑脊髓内、病变内或通过缓释系统或植入物的注射或输注(参见例如Sidman等人,1983,Biopolymers 22:547-556;Langer等人,1981,J.Biomed.Mater.Res.15:167-277;Langer,1982,Chem.Tech.12:98-105;Epstein等人,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688-3692;Hwang等人,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030-4034;美国专利号6,350466和6,316,024)。必要时,组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂,例如利多卡因,以减轻注射部位的疼痛。另外,还可以例如通过使用吸入器或雾化器以及与雾化剂一起配制来进行肺部施用。参见例如美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;PCT公开号WO 92/19244,WO 97/32572,WO 97/44013,WO 98/31346和WO 99/66903,其全部内容通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,使用Alkermes AIR™肺部药物递送技术(Alkermes,Inc.,Cambridge,Mass)施用本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段或组合物。

[0740] 本公开内容的组合物还可使用本领域已知的多种方法中的一种或多种通过一种或多种施用途径来施用。如本领域技术人员将理解的,施用途径和/或方式将根据所需结果而变化。本公开内容的抗体的选择的施用途径包括静脉内、肌内、真皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。肠胃外施用可以代表除肠内和局部施用以外的施用方式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。备选地,本公开内容的组合物可以通过非胃肠道途径,例如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。

[0741] 如果将本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段在控释或缓释系统中施用,则可以使用泵来实现控释或缓释(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:20;Buchwald等人,1980,Surgery 88:501;Saudek等人,1989,N.Engl.J.Med.321:514)。

[0742] 聚合材料可用于实现本公开内容的疗法的控释或缓释(参见例如Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(eds.),CRC Pres.,Boca Raton,

Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen和Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger和Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; 也参见Levy等人, 1985, Science 11 225:190; During等人, 1979, Ann. Neurol. 25:351; Howard等人, 1989, J. Neurosurg. 71:105; 美国专利号5,679,377; 美国专利号5,916,597; 美国专利号5,912,015; 美国专利号5,989,463; 美国专利号5,128,326; PCT公布号W0 99/15154; 和PCT公开号W0 99/20253。用于缓释制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(2-羟基甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙交酯(PLA)、聚乙交酯-共-乙交酯(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施方案中,用于缓释制剂的聚合物是惰性的,不含可浸出的杂质,在储存时稳定,无菌且可生物降解。可以将控释或缓释系统置于预防或治疗靶标的附近,因此仅需要系统剂量的一部分(参见例如Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 同上, vol. 2, pp. 115-138 (1984))。

[0743] 在Langer, 1990, Science 249:1527-1533的综述中讨论了控释系统。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来产生包含一种或多种本公开内容的抗体或其缀合物的缓释制剂。参见例如美国专利号4,526,938, 国际专利公开号W0 91/05548, W0 96/20698, Ning等人, 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy and Oncology 59:179-189, Song等人, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 50:372-397, Cleek等人, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Ml. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 和Lam等人, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Ml. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-160, 其每一个均通过引用整体并入本文。

[0744] 如果本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段是局部施用的, 则其可以配制为软膏、乳膏、透皮贴剂、洗剂、凝胶、洗发水、喷雾剂、气雾剂、溶液、乳液或本领域技术人员众所周知的其他形式。参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。对于不可喷雾的局部剂型, 通常使用包含与局部施用相容的运载体或一种或多种赋形剂并且在某些情况下具有大于水的动态粘度的粘稠至半固体或固体形式。合适的制剂包括但不限于溶液、悬浮液、乳剂、霜剂、软膏剂、粉剂、擦剂、油膏等, 如果需要, 可将它们灭菌或与辅助剂(例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲剂或盐)混合以影响例如渗透压的各种性质。其他合适的局部剂型包括可喷雾的气雾剂制备物, 其中在某些情况下, 将活性成分与固体或液体惰性运载体组合, 包装在与加压的挥发性物质(例如气态推进剂, 例如氟利昂)的混合物中, 或包装在挤压瓶中。如果需要, 也可以将润肤剂或保湿剂添加到药物组合物和剂型中。这种附加成分的实例是本领域众所周知的。

[0745] 如果将包含CXCR5抗体或其抗原结合片段的组合物鼻内施用, 则可以将其配制成气雾剂形式、喷雾剂、雾剂或滴剂形式。特别地, 可以使用合适的推进剂(例如二氯二氟甲

烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体),从加压包装或喷雾器以气雾喷雾形式方便地递送根据本公开内容使用的预防剂或治疗剂。在加压气雾剂的情况下,剂量单位可以通过提供阀以递送计量的量来确定。可以配制用于吸入器或吹入器中的胶囊和药筒(例如由明胶组成),其含有化合物和合适的粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0746] 与第二种治疗剂例如细胞因子、类固醇、化学治疗剂、抗生素或放射线共同施用或治疗的方法是本领域众所周知的(参见例如Hardman等人(eds.)(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,10th ed.,McGraw-Hill,New York,N.Y.;Poole和Peterson(eds.)(2001)Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams和Wilkins,Phila.,Pa.;Chabner和Longo(eds.)(2001)Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams和Wilkins,Phila.,Pa.)。有效量的治疗剂可减少症状至少10%;至少增加20%;至少约30%;至少40%或至少50%。

[0747] 可以与本公开内容的CXCR5抗体或抗原结合片段组合施用的其他疗法(例如预防剂或治疗剂)可以与本公开内容的抗体间隔少于5分钟,间隔少于30分钟,间隔1小时,间隔约1小时,间隔约1至约2小时,间隔约2小时至约3小时,间隔约3小时至约4小时,间隔约4小时至约5小时,间隔约5小时至约6小时,间隔约6小时至约7小时,间隔约7小时至约8小时,间隔约8小时至约9小时,间隔约9小时至约10小时,间隔10小时至约11小时,间隔约11小时至约12小时,间隔约12小时至18小时,间隔18小时至24小时,间隔24小时至36小时,间隔36小时至48小时,间隔48小时至52小时,间隔52小时至60小时,间隔60小时至72小时,间隔72小时至84小时,间隔84小时至96小时,或间隔96小时至120小时来施用。可以在一次同一患者就诊中施用两种或更多种疗法。

[0748] 本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段和其他疗法可以循环施用。循环疗法涉及一段时间内施用第一疗法(例如第一预防或治疗剂),随后一段时间内施用第二疗法(例如第二预防或治疗剂),任选地,然后一段时间内施用第三疗法(例如预防剂或治疗剂),依此类推,然后重复此顺序施用,即循环以减少对疗法之一的耐药性的发展,以避免或减少疗法之一的副作用,和/或以提高疗法的功效。

[0749] 在一个实施方案中,本公开内容的CXCR5抗体可以与用于治疗自身免疫疾病和病症的组合物共同施用,所述组合物包括但不限于阿霉素、硫唑嘌呤、白消安、环磷酰胺(cyclophosphamide)、环孢菌素A、环磷酰胺(Cytoxan)、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、霉酚酸酯、6-巯基嘌呤、皮质类固醇、非甾体抗炎药、西罗莫司(雷帕霉素)和他克莫司(FK-506)。在替代实施方案中,免疫调节剂或免疫抑制剂是选自以下的抗体:muromonab-CD3、阿仑单抗(alemtuzumab) (**Campath®**)、巴利昔单抗(basiliximab)、达利珠单抗(daclizumab)、muromonab (**OKT3®**)、利妥昔单抗、抗胸腺细胞球蛋白和IVIg,以及其他抗体,这些本领域技术人员已知的。

[0750] 在一个实施方案中,本公开内容的CXCR5抗体可以与用于治疗糖尿病的组合物共同施用,所述组合物包括但不限于双胍类(例如丁双胍、二甲双胍和苯甲双胍),激素及其类似物(淀粉样蛋白、胰岛素、门冬胰岛素、地特胰岛素、甘精胰岛素、赖谷胰岛素、赖脯胰岛素、利拉鲁肽和普兰林肽),磺酰脲类衍生物(乙酰己酰胺、卡布丁酰胺、氯丙酰胺、格列本

脲、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列酮、格列昔布、格列本脲、格列丁噻唑、格列丁唑、格列己脲、格列美定、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲和甲磺环己脲), 噻唑烷二酮类(吡格列酮、罗格列酮和曲格列酮), 阿卡波糖, 艾塞那肽, 米格列醇, 米格列奈, 穆拉格他扎, 那格列奈, 瑞格列奈, 西他列汀, tesaglitazar, 维达列汀和伏格列波糖。

[0751] 在某些实施方案中, 可以配制本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段以确保在体内适当分布。例如血脑屏障(BBB) 排除了许多高度亲水的化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过BBB(如果需要的话), 可以将它们配制在例如脂质体中。对于制造脂质体的方法, 参见例如美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包含一个或多个部分, 其被选择性地运输到特定细胞或器官中, 从而增强靶向药物的递送(参见例如V.V.Ranade,1989,J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如美国专利5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038);抗体(P.G.Bloeman等人,1995,FEBS Lett.357:140;M.Owais等人,1995, Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等人(1995) Am.J.Physiol.1233:134);p120(Schreier等人(1994) J.Biol.Chem.269:9090);也参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen,1994,FEBS Lett.346:123;Killion;Fidler,1994; Immunomethods 4:273。

[0752] 本公开内容提供了向由此需要的受试者单独或与其他疗法组合施用包含本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段的药物组合物的方案。本公开内容的组合疗法的疗法(例如预防剂或治疗剂)可以同时或顺序地施用给受试者。本公开内容的组合疗法的疗法(例如预防剂或治疗剂)也可以循环施用。循环疗法涉及一段时间内施用第一疗法(例如第一预防或治疗剂),随后一段时间内施用第二疗法(例如第二预防或治疗剂)并重复此顺序施用,即循环,以减少对疗法之一(例如药剂)的抗药性的发展,以避免或减少疗法之一(例如药剂)的副作用,和/或以提高疗法的功效。

[0753] 本公开内容的组合疗法的疗法(例如预防剂或治疗剂)可以同时施用给受试者。术语“同时”不限于精确地同时施用疗法(例如预防剂或治疗剂),而是意味着包含本公开内容的CXCR5抗体或其抗原结合片段的药物组合物按顺序和在一定时间间隔内施用给受试者,从而使得本发明的抗体或其缀合物可以与其他疗法一起发挥作用,以提供比它们以其他方式施用更大的益处。例如每种疗法可以同时或以任何顺序在不同的时间点顺序地施用给受试者;但是,如果不能同时施用,则应在足够近的短时间内施用它们,以提供所需的治疗或预防效果。每种疗法可以以任何合适的形式和通过任何合适的途径分别施用给受试者。在各种实施方案中,将治疗剂(例如预防剂或治疗剂)以少于15分钟,少于30分钟,间隔少于1小时,间隔约1小时,间隔约1小时至约2小时、间隔约2小时至约3小时,间隔约3小时至约4小时,间隔约4小时至约5小时,间隔约5小时至约6小时,间隔约6小时至约7小时、间隔约7小时至约8小时,间隔约8小时至约9小时,间隔约9小时至约10小时,间隔约10小时至约11小时,间隔约11小时至约12小时,间隔24小时,间隔48小时,间隔72小时,或间隔1周施用给受试者。在其他实施方案中,可以在同一患者就诊中施用两种或更多种疗法。

[0754] 组合疗法的预防剂或治疗剂可以在相同药物组合物中施用给受试者。备选地,可以在分开的药物组合物中向受试者同时施用组合疗法的预防剂或治疗剂。预防剂或治疗剂可以通过相同或不同的施用途径施用给受试者。

[0755] VIII. 试剂盒

[0756] 本公开还提供了包含本文所述的任何或所有抗体的试剂盒。本公开内容的试剂盒包括一个或多个容器,其包含本文所述的CXCR5抗体和根据本文所述的公开内容的任何方法的使用说明书。通常,这些说明书包括用于上述治疗方法的抗体施用的描述。在一些实施方案中,提供了用于产生单剂量施用单位的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒既可以包含具有干燥的蛋白质的第一容器和包含具有水性制剂的第二容器。在某些实施方案中,包括含有施用器的试剂盒,例如单腔室和多腔室预填充注射器(例如液体注射器和溶血针)。

[0757] 与使用CXCR5抗体有关的说明书通常包括关于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。在本公开内容的试剂盒中提供的说明书通常是在标签或包装插页(例如试剂盒中包括的纸张)上的书面说明书,但是机器可读的说明书(例如在磁性或光学存储盘上携带的说明书)也是可以接受的。

[0758] 本公开内容的试剂盒处于合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、广口瓶、软包装(例如密封的聚酯或塑料袋)等。还考虑了与特定装置例如吸入器、鼻腔施用装置(例如雾化器)或输注装置例如微型泵组合使用的包装。试剂盒可以具有无菌的进出口(例如容器可以是静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。容器还可以具有无菌进出口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本公开内容的CXCR5抗体。容器可以进一步包含第二药物活性剂。

[0759] 试剂盒可以任选地提供其他组分,例如缓冲液和解释性信息。通常,试剂盒包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装插页。

[0760] 本公开还提供了诊断试剂盒,其包含本文所述的任何或所有抗体。诊断试剂盒可用于例如检测样品中CXCR5的存在。在一些实施方案中,诊断试剂盒可用于鉴定患有潜在疾病、病症或病状的个体,其可能使他们处于发展CXCR5介导的疾病、病症或病状或者CXCR5缺乏性疾病、病症或病状的风险中。在一些实施方案中,诊断试剂盒可用于检测怀疑患有CXCR5介导的疾病或CXCR5缺乏性疾病、病症或病状的个体中CXCR5的存在和/或水平。

[0761] 本公开内容的诊断试剂盒包括一个或多个容器,其包含本文所述的CXCR5抗体和根据本文所述的公开内容的任何方法的使用说明书。通常,这些说明书包括使用CXCR5抗体检测有风险患有或怀疑患有CXCR5介导的疾病或CXCR5缺乏性疾病、病症或病况的个体中CXCR5的存在的描述。在一些实施方案中,示范性诊断试剂盒可被配置为含有反应剂,例如CXCR5抗体、阴性对照样品、阳性对照样品以及试剂盒的使用说明书。

[0762] IX. 等同方式

[0763] 前述描述和以下实施例详述了本公开内容的某些特定实施方案,并描述了发明人考虑的最佳模式。然而,将理解的是,无论前述内容可能在文本中出现的多么详细,都可以以许多方式来实践本公开,并且应当根据所附权利要求书及其任何等同方式来解释本公开内容。

[0764] 尽管已经参考多种应用、方法、试剂盒和组合物描述了所公开的教导,但是应当理解,在不脱离本文的教导和以下要求保护的公开内容的情况下,可以进行多种改变和修改。提供以下实施例以更好地示例说明所公开的教导,且无意限制本文提出的教导的范围。尽

管已经根据这些示例性实施方案描述了本教导,但是本领域技术人员将容易理解这些示例性实施方案的多种变化和修改是可能的,而无需过多的实验。所有这些变型和修改都在本发明教导的范围内。

[0765] 本文所引用的所有参考文献,包括专利、专利申请、论文、教科书等,以及其中所引用的参考文献,如果尚未被引用,则其通过引用全部并入本文。如果一个或多个所并入的文献和类似材料与本申请不同或相矛盾,包括但不限于所定义的术语、术语用法、所描述的技术等,则以本申请为准。

[0766] X. 一般技术

[0767] 应当理解,本发明不限于当然可以变化的特定合成方法。除非本文另有定义,否则与本发明结合使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另外要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。通常,本文描述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学以及杂交相关的命名法和技术的本领域众所周知的和常用的。

[0768] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在本领域技术范围内。此类技术已在文献中得到充分说明,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,second edition (Sambrook et al.,1989) Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait,ed.,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis,ed.,1998) Academic Press;Animal Cell Culture (R.I.Freshney,ed.,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998) Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures (A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell,eds.,1993-1998) J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology (Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir和C.C.Blackwell,eds.);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos,eds.,1987);Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel et al.,eds.,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis et al.,eds.,1994);Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan et al.,eds.,1991);Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd.ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(2001);

[0769] Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley& Sons,NY(2002);Harlow和Lane Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(1998);Coligan et al.,Short Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons,NY(2003);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology (C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies (P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach (D.Catty.,ed., IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach (P.Shepherd和C.Dean,eds.,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual (E.Harlow和D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies (M.Zanetti和J.D.Capra,eds.,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0770] 酶促反应和纯化技术根据制造商的说明进行,如本领域通常完成的或如本文所述。本文描述的与分析化学、生物化学、免疫学、分子生物学、合成有机化学以及药物和药物化学结合使用的命名法及其实验室程序和技术是本领域众所周知的和通常使用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制、和递送和患者治疗。

[0771] XI. 生物保藏

[0772] 本发明的代表性材料于2017年7月26日保藏在美国典型培养物保藏中心, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA。载体h11G2-VH (XC155) 具有ATCC保藏号为PTA-124323, 包含编码抗体h11G2 (XC155) 的重链可变区的DNA插入物, 而载体h11G2-VL (XC154) 具有ATCC保藏号PTA-124324, 包含编码抗体h11G2 (XC154) 的轻链可变区的DNA插入物。这些保藏是根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约》(《布达佩斯条约》) 的规定进行的。这样可以确保从保藏之日起30年内保持保藏物的存活培养物。保藏物根据《布达佩斯条约》的条款由ATCC提供, 并须遵守Pfizer Inc. 与ATCC之间的协议, 该协议可确保相关美国专利的发布或任何美国或外国专利申请向公众开放时(以先到者为准), 向公众永久且不受限制地提供保藏物的培养物的后代, 并确保由美国专利商标局局长根据35USC第122条及局长的规定(包括37C.F.R. 第1.14条, 特别是参考8860G 638) 确定其后代可获得性。

[0773] 本申请的所有者已经同意, 如果在适当条件下培养时所保藏的材料培养物死亡或丢失或破坏, 则将在通知后立即将材料替换为同一材料的另一个。所保藏的材料的可获得性不应解释为违反任何政府根据其专利法在授权下的权利来实施发明的许可。

实施例

[0774] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本公开内容。提供这些实施例仅出于示例说明的目的, 除非另有说明, 否则它们不旨在构成限制。因此, 本公开内容绝不应被解释为限于以下实施例, 而应被解释为涵盖由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变型。

[0775] 实施例1: 与人CXCR5和cynoCXCR5结合的杂交瘤

[0776] 用含有过表达人CXCR5 (SEQ ID NO:32) 的 1×10^6 个BaF3细胞或表达人CXCR5 (SEQ ID NO:32) 的300.19细胞与5 μ g CPG (ODN1826) (Invivogen) 佐剂的混合物免疫雌性BALB/c小鼠3次, 连续间隔三个星期。在最后一次加强免疫后, 使用MembranePro™ Functional Protein Expression System (Thermo Fisher), 用20 μ g由过表达人CXCR5 (SEQ ID NO:32) 的HEK-293细胞制成的病毒样颗粒 (VLP) 免疫小鼠。进行了五轮融合并产生了88个克隆, 这些克隆结合表达人CXCR5的HEK-293细胞 (hCXCR5-293)。通过蛋白A纯化这些单克隆抗体, 并测试与hCXCR5 HEK-293和表达食蟹猴CXCR5 (SEQ ID NO:33) 即cynoCXCR5-293的HEK-293细胞的结合。用10 μ g/ml单克隆抗体对hCXCR5-293或cynoCXCR5-293细胞进行染色, 然后用抗小鼠IgG PE (Southern Biotech) 染色。使用FACSVerse分析仪 (BD Biosciences) 通过流式细胞术分析细胞。筛选与hCXCR5 HEK-293和cynoCXCR5 HEK-293细胞的结合, 鉴定了三十四结合人和食蟹猴CXCR5的抗体 (图3)。

[0777] 实施例2: 抗CXCR5抗体与Raji细胞的结合和在钙流测定法中拮抗剂活性

[0778] 使用FACSVerse分析仪 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 通过流式细胞术进

一步分析结合hCXCR5-293和cynoCXCR5-293细胞两者的抗体的对Raji细胞的细胞结合。将抗体与Raji细胞结合的表现亲和力计算为平衡结合滴定曲线的EC₅₀,其中通过流式细胞术对抗原结合群的几何平均荧光强度(gMFI)进行定量,结果示于表2。

[0779] 数据证明某些抗体与Raji细胞的结合程度大于/小于其他抗体。这些数据证明抗体识别衍生自伯基特淋巴瘤患者的Raji细胞上的内源性CXCR5,表明抗体可以在体内结合B细胞。此外,抗体11G2对Raji细胞上的CXCR5的亲和力高于参考抗CXCR5抗体16D7(WO2009/032661),表明11G2可能比16D7更有效。

[0780] 还在钙流测定法中测试了结合hCXCR5-293和cynoCXCR5-293二者的抗体的拮抗活性。另外,包括参考抗CXCR5抗体16D7(WO2009/032661)作为对照。简言之,将hCXCR5 HEK-293细胞铺板在96孔板中DMEM高葡萄糖培养基中。过夜培养后,除去培养基,并将100μl的1X Fluo-4 NW(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)添加到细胞中。然后将细胞在37℃温育1小时。将单克隆抗体的系列稀释液添加到细胞中,并在室温下温育一小时。通过添加111nM的重组hCXCL13(BPS Bioscience,San Diego,CA),在Flexstation(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)上以485nM激发和525nM发射测量钙流。以1.52秒的间隔收集数据。仪器通过从最高读数中减去最低读数来确定钙流。使用**GraphPadPrism®**(6.0版,GraphPad Software,Inc.,San Diego,CA)非线性回归曲线拟合和激动剂剂量反应模型的S形对数来确定抑制配体诱导的钙流的IC₅₀值(表2)。抑制钙流是功能性拮抗作用的证明。因此,11G2抗体不仅是通过ADCC的有效耗尽剂,而且还是提供第二种作用机制的拮抗剂。抗体11G2的拮抗作用与比较物抗体例如2C9(参考抗体,参见例如WO 2012/010582)和16D7(参考抗体,参见例如WO 2009/032661)相当。cAMP报告基因测定数据也证明了功能性拮抗作用(见下文)。

[0781] 表2

[0782]

抗体(杂交瘤)	Raji细胞结合EC ₅₀ (nM)	Ca ²⁺ 流IC ₅₀ (nM)
5H3	4.767	13.60
5H7	1.014	5.555
11G2	0.9679	5.929
31E5	0.7292	5.050
18G4	0.7454	13.86
19D9	0.9022	9.395
20G4	0.5178	9.853
21A3	1.226	9.043
23F1	0.4062	6.982
39H4	0.3154	未测试
47D11	0.8493	9.448
56G2	0.3871	14.36
4F1	0.4202	9.739
15D5	0.7949	11.21
20D10	0.3259	11.03

6E9	0.5879	14.28
12E11	0.6493	13.40
16D10	0.7862	14.47
26E2	1.424	18.40
1A11	0.4936	35.06
1D10	0.2164	33.66
10G2	0.4571	14.74
9G11	0.4976	38.61
12C3	0.4868	35.01
25E1	0.7682	14.13
18G11	0.3161	5.034
23D5	0.1483	5.886
31G7	0.2848	9.084
31F3	0.2705	18.23
51D11	0.2525	7.429
41A10	0.8046	14.67
48A10	0.7083	21.07
13F4	0.6225	未测试
3A1	0.2572	20.22
19F8	2.378	30.03
2C9	0.21	3.486
16D7	0.65	11.43

[0783] 实施例3:抗CXCR5抗体重链和轻链可变区的克隆

[0784] 使用RNeasy迷你试剂盒 (Qiagen,Hilden,Germany) 裂解产生实施例2中测定的抗体的杂交瘤,并然后使用superscript III第一链合成系统(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)合成cDNA的第一链。使用小鼠轻链和重链简并引物通过PCR扩增轻链和重链可变区(VL和VH),所述引物包含表16中所示的SEQ ID NO:64-88的核酸序列。PCR后,将VL和VH克隆到Zero blunt TA载体(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中,然后对其进行测序。11G2、5H7和41A10抗体的小鼠VL和VH的氨基酸序列显示在表16中的SEQ ID NO:35-40。CDR加下划线。

[0785] 实施例4:非岩藻糖基化和岩藻糖基化的嵌合抗体的产生

[0786] 为了评估非岩藻糖基化和岩藻糖基化对抗体活性的影响,在哺乳动物细胞中产生了来自实施例3的抗体的岩藻糖基化的和非岩藻糖基化的形式

[0787] 将目标抗体的VL和VH进一步克隆到分别含有人 κ 恒定区和人IgG1恒定区的载体中。将可变重链区克隆到含有人IgG1恒定区(SEQ ID NO:89)的pSMED2哺乳动物表达载体中,产生嵌合小鼠-人全长重链。将可变轻链区克隆到含有人 κ 恒定区(C κ)(SEQ ID NO:90)的pSMEN3哺乳动物表达载体中,以产生嵌合小鼠-人全长轻链。

[0788] 将含有嵌合抗体基因的载体瞬时转染到HEK-293F细胞(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中以产生岩藻糖基化的嵌合抗体。然后使用蛋白A柱纯化岩藻糖

基化的嵌合抗体。使用FACSVerse分析仪 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) 通过流式细胞术确定嵌合抗体与Raji细胞结合的表现亲和力 (细胞结合EC50), 并显示在表3中。

[0789] 表3

抗体 (嵌合)	Raji 细胞结合 EC50 (nM) (岩藻糖基化的)	CynoCXCR5-300.19 细胞 EC50 (nM) (岩藻糖基化的)
5H7	0.04215	0.06027
11G2	0.01746	0.02419
31E5	未测试	0.05151
23F1	0.1687	66.03
47D11	0.4292	13.85
56G2	0.07613	6.376
4F1	0.3209	14.08
15D5	0.2695	1.387
20D10	0.1624	0.1478
6E9	未测试	18.26
12E11	0.2883	未测试
16D10	0.2909	未测试
1A11	0.08464	0.2575
1D10	0.1530	未测试
10G2	1.008	未测试
12C3	0.1035	0.1767
25E1	0.4487	11.73
23D5	0.03410	4.168
31G7	未测试	12.83
31F3	0.07858	4.072
51D11	0.08732	49.63
41A10	0.3899	0.8308
13F4	0.5557	4.381
3A1	0.09156	0.3059
2C9	0.09989	0.1305

[0790]

[0791] 使用 **Potelligent**[®] CHOK1SV细胞系 (BioWa/Lonza, Allendale, NJ) 产生非岩藻糖基化的嵌合抗体, 其缺乏负责岩藻糖添加的基因 (α -1, 6-岩藻糖基转移酶, FUT8) 的两个等位基因。将含有人 κ 恒定区的嵌合轻链克隆到Lonza pEE12.4 GS载体 (Lonza Biologics, Basel, Switzerland) 中, 并将含有人IgG1恒定区的嵌合重链克隆到Lonza pEE6.4 GS载体中 (Lonza Biologics, Basel, Switzerland)。通过NotI和PvuI的消化来纯化来自pEE6.4的重链表达盒, 并然后将其克隆到含有嵌合轻链的pEE12.4中的NotI和PvuI位点。将含有重链和轻链表达盒的最终载体DGV用PvuI进行线性化, 然后电穿孔到**Potelligent**[®] CHOK1SV细胞中。转染后24小时后, 将**Potelligent**[®]细胞以3-5K细胞/孔铺板到96孔板中CDCHO培养基中 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 其中补充有1XHT (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA)、1mM尿昔(Sigma, St. Louis, MO)和50 μ M MSX(EMD Millipore, Billerica, MA)。培养三至四周后,测定来自克隆的上清液在Octet(Pall Fortebio, Fremont, CA)上的抗体滴度。高表达克隆进一步扩大规模用于抗体生产。然后将非岩藻糖基化的嵌合抗体在蛋白A柱上纯化。

[0792] 为了确定抗体对CXCR5的特异性,评估了抗体与表达其他细胞因子的细胞的结合。简言之,将表达CXCR1、CXCR2或CXCR3的FlowCelect趋化因子受体细胞系(EMD Millipore, Billerica, MA)和表达CXCR4的Jurkat(ATCC, Manassas, VA)用5 μ g/ml或10 μ g/ml的每种抗CXCR5嵌合抗体进行染色。然后将细胞与缀合有PE的山羊抗人(Southern Biotech, Birmingham, AL)温育,然后使用FACSVerse分析仪(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)通过流式细胞术进行分析。如图4A-4D所示,与阳性对照相比,所有嵌合抗体显示出与表达CXCR1(图4A)、CXCR2(图4B)、CXCR3(图4C)的细胞或CXCR4/Jurkat细胞(图4D)的结合非常低。

[0793] 实施例5:小鼠单克隆抗体的人源化

[0794] 为了避免任何潜在的HAMA(人抗小鼠抗体)免疫原性,使用来自IGKV1-39的人种系框架序列(DPK9轻链可变结构域,GenBank登录号X93627.1,SEQ ID NO:93)和来自IGHV3的人种系框架序列(DP54重链可变结构域,GenBank登录号AB019440,SEQ ID NO:91)对41A10(C-41A10)和11G2(C-11G2)嵌合抗体进行人源化。

[0795] 嵌合抗体11G2(C-11G2)和嵌合抗体41A10(C-41A10)的人源化形式通过互补决定区(CDR)移植(下文称为“CDR移植”)产生。换言之,重链CDR被移植到具有JH4区段(SEQ ID NO:92)的人DP-54框架区(VH3亚类;SEQ ID NO:91),而轻链CDR被移植到具有JK4区段(SEQ ID NO:94)的人DPK9框架(VK1亚类;SEQ ID NO:93)。

[0796] 将人源化的VH区与人IgG1恒定区(SEQ ID NO:89)连接,然后亚克隆到专有表达载体中以产生CDR-移植的重链,包括但不限于SEQ ID NO:96(11G2 CDR移植VH)。将人源化的VL区与人 κ 恒定区(SEQ ID NO:90)融合,然后亚克隆到专有表达载体中以产生CDR移植的轻链,包括但不限于SEQ ID NO:97(11G2 CDR移植VL)。

[0797] 实施例6:非岩藻糖基化的或岩藻糖基化的抗CXCR5抗体的结合亲和力

[0798] 评估了嵌合和人源化的CXCR5岩藻糖基化的和非岩藻糖基化的抗体对细胞表面CXCR5的表观亲和力。更具体地,为了确定嵌合和人源化的CXCR5抗体对表达CXCR5的细胞的表观亲和力,对人和食蟹猴外周血单核细胞(PBMC)和人扁桃体单核细胞(TMC)进行了细胞结合实验。将CXCR5 mab与CXCR5+细胞(B细胞、真正Tfh细胞和循环Tfh样细胞)结合的表观亲和力计算为平衡结合滴定曲线的EC50,其中抗原结合群体的几何平均荧光强度(gMFI)通过流式细胞术对进行定量。

[0799] 来自健康人供体,来自**Trima®**单采血液采集并富集PBMC的**Trima®**残留物获自Blood Centers of the Pacific(San Francisco, CA)。根据制造商的说明(STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada),使用SepMate™管和Lymphoprep™通过密度梯度离心法分离PBMC。

[0800] 扁桃体单核细胞(TMC)从获自BioOptions(Brea, CA)的人扁桃体中分离。简言之,使用无菌手术刀在冷的RPMI 1640培养基中将扁桃体切成小片段(3-4mm)。然后在37°C在消化培养基(3mL 10x胶原酶、300 μ L 100x脱氧核糖核酸酶(DNase)、6.7mL RPMI 1640)中消化

扁桃体组织30分钟。加入补充有10%胎牛血清(FBS)的RPMI1640以中和酶的活性,然后依次通过尼龙滤细胞滤网(70 μ m和40 μ m网眼大小的尼龙)来过滤组织。离心后,使用氯化铵裂解缓冲液对沉淀进行红细胞裂解。在磷酸盐缓冲盐水(PBS)/2%FBS/2mM乙二胺四乙酸(EDTA)中使用低速离心(200 \times g)10分钟除去血小板。根据制造商的说明(STEMCELL Technologies,Vancouver,BC,Canada),使用EasySep™人CD4+T细胞富集试剂盒从TMC混合物中纯化出CD4+T细胞。

[0801] 分离后,将PBMC以每孔 1.0×10^5 个细胞的密度铺板,并将CD4+TMC以每孔 2.0×10^5 个细胞的密度铺板在96孔U型底板中的分离缓冲液(含1%FBS和1mM EDTA的PBS)中。然后在室温将板以1500rpm离心5分钟。将PBMC和CD4+TMC重悬于荧光活化细胞分选(FACS)缓冲液(含1%FBS的PBS)中,该缓冲液含有人结晶的片段Fc块(每孔2 μ L;Biolegend)和4倍系列稀释的抗体(11-点稀释系列,PBMC从5000ng/mL开始,CD4+TMC从312.5ng/mL开始)并在冰上温育2小时。然后用FACS缓冲液洗涤PBMC和CD4+TMC 3次,并重悬于50-100 μ L的FACS缓冲液中,该FACS缓冲液含有用于染色淋巴细胞亚群的荧光缀合抗体和针对人Ig的荧光缀合二抗,以检测CXCR5单克隆抗体(mAb)。在4 $^{\circ}$ C温育30分钟后,用FACS缓冲液洗涤PBMC和CD4+TMC 2次,并重悬于125 μ L含0.5%多聚甲醛(PFA)的PBS中。将板保存在4 $^{\circ}$ C,直到通过流式细胞术进行分析(BD LSRFortessa™细胞分析仪,BD Biosciences,Franklin Lakes,NJ)。

[0802] 通过将抗原结合群体的gMFI相对于CXCR5抗体浓度的对数进行作图来产生细胞结合滴定曲线。使用GraphPad **Prism**®(6.0版,GraphPad Software,Inc, San Diego,CA)非线性回归曲线拟合和激动剂剂量应答模型的S形对数,根据以下公式确定EC₅₀值。

[0803] $\text{Log}(\text{激动剂}) \text{ vs. 应答-可变斜率(四参数)}$

[0804] $Y = \text{底} + (\text{顶} - \text{底}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}})$

[0805] 其中Y是gMFI,X是抗体浓度,顶是对应于S形曲线的上平台的最大Y值,底是对应于S形曲线的下平台的最小Y值,并且LogEC₅₀是曲线拐点处抗体浓度的对数。

[0806] 在进行多次重复时,使用平均值和标准差(STDEV)总结了实验中的EC₅₀值。结果(即,对于表达CXCR5的细胞,岩藻糖基化或非岩藻糖基化的嵌合和人源化的CXCR5 mAb的平均表观亲和力)显示在表4中。结果还包括使用抗CXCR5对照抗体2C9(WO 2012/010582)、16D7(WO 2009/032661)和11A7(WO 2016/028573)获得的亲和力结合数据,其包括在内用于比较。请注意,具有各种VL和VH组合(即h11G2 XC51/XC152、h11G2 XC153/XC155、h11Gh11G2 XC153/XC156、h11G2 XC154/XC155和h11G2 XC154/XC157)的岩藻糖基化的和非岩藻糖基化的嵌合和人源化的11G2抗体对人B细胞的表观亲和力近似相等。换言之,数据表明非岩藻糖基化似乎不影响抗体对表达CXCR5的细胞的亲和力。此外,数据显示,h11G2 XC154/XC155抗体(岩藻糖基化的和非岩藻糖基化的)表现出其亲和力是对照抗CXCR5抗体2C9的约10倍并且其亲和力是11A7的约100倍。对照抗CXCR5抗体16D7未显示可饱和结合。这些数据证明非岩藻糖基化不影响11G2抗体与表达CXCR5的细胞结合的亲和力。由于亲和力是表位和抗体抗原结合位点(即互补位)之间相互作用强度的量度,因此这些数据表明即使抗体结合相似的表位,它们也不会以与11G2相同的强度结合该表位。

[0807] 表4

CXCR5 mAb	表观亲和力 平均 EC50 ± STDEV (pM)				
	人 B 细胞	人 Tfh-样 细胞	人 Tfh 细胞	NHP B 细胞	NHP Tfh- 样细胞
嵌合 41A10	161.28 ± 33.41	ND	ND	548.55	ND
人源化的 41A10 142/147	153.38 ± 57.21	ND	ND	2049.50	ND
人源化的 41A10 142/148	152.29 ± 75.51	ND	ND	1961.00	ND
嵌合 11G2	17.94 ± 8.48	ND	8.46	6.95	ND
非岩藻糖基化的嵌合 11G2	8.09 ± 2.93	ND	45.59	ND	ND
[0808] 人源化的 11G2 151/152	13.05 ± 10.9	ND	3.33	10.06	ND
人源化的 11G2 153/155	7.79 ± 6.89	ND	4.82	7.03	ND
人源化的 11G2 153/156	8.88 ± 6.39	ND	3.23	7.06	ND
人源化的 11G2 154/155	7.08 ± 4.48	5.92 ± 1.55	8.25	4.13	5.65
人源化的 11G2 154/157	19.12 ± 16.83	ND	7.24	8.65	ND
非岩藻糖基化的人源化的 11G2 154/155	6.60 ± 2.33	5.89 ± 1.40	10.59	1.32	10.47
2C9 (参考抗体)	65.59 ± 37.95	ND	ND	ND	ND
16D7 (参考抗体)	非饱和的	ND	ND	ND	ND
11A7 (参考抗体)	563.63 ± 249.39	ND	ND	ND	ND

[0809] 实施例7:非岩藻糖基化的或岩藻糖基化的人源化的11G2抗体与岩藻糖基化的参考抗体相比的浓度依赖性结合

[0810] 将岩藻糖基化的人源化的11G2 (h11G2 VL XC154/VH XC155也称为h11G2 154/155或h11G2 XC154/XC155) 和非岩藻糖基化的人源化的11G2 CXCR5 (非岩藻糖基h11G2 154/155) 与人PBMC B细胞的浓度依赖性结合与比较物mAb 2C9、16D7和11A7的结合进行比较。通过将抗原结合群体的gMFI相对于CXCR5抗体浓度的对数进行作图来产生细胞结合滴定曲线并显示在图5中。

[0811] 数据证明岩藻糖基化的和非岩藻糖基化的h11G2 154/155具有相同的曲线,表明在至少一个(但优选地,两个)抗体恒定链上在Asn297上是否存在N-连接糖型上的岩藻糖不影响抗体对细胞上存在的CXCR5的亲合力。

[0812] 此外,数据进一步证明了岩藻糖基化的(实心圆, 9.630×10^{-12} M) 和非岩藻糖基化的(空心圆, 1.188×10^{-11} M) 的h11G2 154/155抗体的EC50与比较物抗体:2C9(实心三角形, 6.24×10^{-11})、11A7(实心菱形, 9.265×10^{-10}) 和16D7(实心正方形, 大约0.004945, 它不饱和)的EC50相比低得多。这些数据显示h11G2 154/155抗体具有与比较物抗体不同的结合特征。因此,这些数据表明11G2抗体和2C9、11A7和16D7不结合CXCR5上的相同表位。

[0813] 实施例8:嵌合和人源化的CXCR5抗体的ADCC活性

[0814] 为了确定嵌合和人源化的CXCR5抗体的群组刺激的活性依赖性细胞毒性(ADCC)的效力和效能,将CXCR5抗体或同种型对照的连续稀释液与来自健康的人供体或食蟹猴的外周血单核细胞(PBMC)温育。在该测定法中,PBMC是自然杀伤(NK)效应子细胞以及靶B细胞和Tfh样细胞的来源。流式细胞术用于定量大约20小时后剩余的B细胞和Tfh样细胞的数量。类似地,使用从扁桃体单核细胞分离的CD4+T细胞以及添加从PBMC中分离的NK细胞,评估人源化的抗体诱导来自人扁桃体的真正Tfh细胞的ADCC的能力。

[0815] 如实施例6中所述,来自健康人供体,来自**Trima®**单采血液采集并富集PBMC的**Trima®**残留物获自Blood Centers of the Pacific (San Francisco, CA)。根据制造商的说明 (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada), 使用SepMate™管和Lymphoprep™通过密度梯度离心分离PBMC。分离后,将PBMC以 2.0×10^5 个细胞/孔的密度铺板在完全RPMI培养基中在U型底96孔板中。

[0816] 在该测定法中, PBMC是自然杀伤(NK)效应子细胞以及靶B细胞和Tfh样细胞的来源。将CXCR5 mAb或同型对照的连续稀释液添加到孔中,并将细胞在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 温育大约20小时。然后将板在室温(RT)以1800rpm离心5分钟。然后,用冰冷的FACS洗涤PBMC,并重悬于 $50\mu\text{l}$ 的冰冷的FACS缓冲液中,该缓冲液包含用于染色淋巴细胞亚群的荧光缀合抗体。在 4°C 温育15-30分钟后,用冰冷的FACS缓冲液洗涤PBMC 2次,并重悬于 $100\mu\text{l}$ 含 0.5% 多聚甲醛(PFA) PBS中。将CountBright™ Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific) 添加到每个孔中(每孔 $15\mu\text{l}$)。将板保存在 4°C ,直到通过流式细胞术(BD LSRFortessa™细胞分析仪)进行分析。

[0817] 还如先前实施例6中所述分离扁桃体单核细胞(TMC)。

[0818] 根据实施例6所述的方法制作细胞毒性滴定曲线。当进行多个重复时,使用平均和标准差(STDEV)总结实验中的 EC_{50} 值。结果显示在表5中。使用抗CXCR5参考抗体2C9、16D7和11A7获得的数据包括在内用于比较。

[0819] 表5

[0820] 嵌合和人源化的CXCR5 mAb对表达CXCR5的细胞的平均细胞毒性

CXCR5 mAb	ADCC 活性			
	平均 $\text{EC}_{50} \pm \text{STDEV}$ (pM)			
	人 B 细胞	人 Tfh 样细胞	人 Tfh 细胞	NHP B 细胞
嵌合 41A10	11732.28 ± 24781.14	ND	ND	ND
非岩藻糖基嵌合 41A10	54.47 ± 89.71	ND	ND	ND
人源化的 41A10 142/147	1245 ± 881.03	ND	ND	ND
人源化的 41A10 142/148	1109.25 ± 1081.15	ND	ND	ND
嵌合 11G2	564.01 ± 1643.77	ND	1.55	115.26
[0821] 非岩藻糖基嵌合 11G2	4.39 ± 3.08	ND	0.07	ND
人源化的 11G2 151/152	376.74 ± 606.13	ND	ND	43.61
人源化的 11G2 153/155	463.17 ± 670.85	ND	ND	20.72
人源化的 11G2 153/156	567.68 ± 847.34	ND	ND	28.06
人源化的 11G2 154/155	253.72 ± 672.14	7.978	0.77	39.14
人源化的 11G2 154/157	517.33 ± 1062.82	ND	ND	54.02
非岩藻糖基人源化的 11G2 154/155	2.01 ± 2.28	4.82 ± 2.88	0.11	15.26 ± 11.65
2C9	380.31 ± 757.04	ND	ND	ND
16D7	2590.61 ± 6343.88	ND	ND	ND
11A7	4.35 ± 4.03	ND	ND	ND

[0822] 本文公开的数据证明,即使是岩藻糖基化的,h11G2 154/155抗体也具有与比较物抗体2C9 (380.31 ± 757.04) 和16D7 (2590.61 ± 6343.88) 相比更大的ADCC活性 ($253.72 \pm$

672.14)。岩藻糖基化的抗体11A7的ADCC活性高于任何测试的岩藻糖基化的抗体。但是,数据显示,非岩藻糖基化的h11G2 154/155具有比任何测试的抗体包括岩藻糖基化的11A7更高的ADCC活性。本文呈现的表征研究证明嵌合CXCR5 mAb41A10和11G2触发人B细胞的ADCC,具有EC50分别为11.73nM和0.56nM。嵌合CXCR5 mAb 41A10和11G2的非岩藻糖基形式将ADCC活性的效力提高了至少约100倍。人源化的变体以与其相应的嵌合对应物相当或更高的效力触发人B细胞的ADCC。与嵌合CXCR5 mAb一样,非岩藻糖基人源化的变体与其正常岩藻糖基化的对应物相比,将ADCC的效力提高了至少约100倍。非岩藻糖基h11G2在ADCC上比2C9和16D7的岩藻糖基化形式更有效,而非岩藻糖基h11G2至少与岩藻糖基化的11A7相当。

[0823] 实施例9:11G2抗体拮抗CXCL13信号传导

[0824] 为了确定CXCR5抗体是否在功能上拮抗CXCL13信号传导,在稳定表达人CXCR5的工程化细胞系中使用了环腺苷一磷酸(cAMP)报告分子测定法。在这些细胞中,CXCL13以浓度依赖性方式抑制由毛喉素触发的cAMP产生。

[0825] 为了确定CXCR5抗体是否在功能上拮抗CXCL13信号传导,在稳定表达人CXCR5的CHO-K1细胞中进行了Hit **Hunter®**cAMP测定法(DiscoveRx Corporation,Fremont,CA)。在该测定法中,当产生cAMP时,通过酶片段互补形成活性的 β -半乳糖苷酶(β -gal)。然后, β -gal可以转换化学发光底物,产生可在标准酶标仪上检测到的输出信号。CXCR5的配体CXCL13以浓度依赖性方式抑制由毛喉素(20 μ M)触发的cAMP产生。为了测试CXCR5抗体抑制CXCL13介导的毛喉素诱导的cAMP产生的效力和功效,在毛喉素(20 μ M)和CXCL13(用于其IC₈₀为600pM使用)存在下,将每种CXCR5抗体的系列稀释液添加到表达CXCR5的CHO-K1细胞中。

[0826] 根据对实施例6所述的包括EC₅₀值确定制作功能拮抗滴定曲线。结果示于表6。

[0827] 表6

[0828] 在CXCR5+CHO-K1细胞中体外刺激CXCL13抑制的cAMP产生

CXCR5 mAb	EC ₅₀ (pM)	CXCL13抑制%
人源化的11G2 154/155	752.9	120.6
2C9	793.1	113.5
16D7	1104	102.4
11A7	1401	105.9

[0830] 在分开的研究中,测试了非岩藻糖基人源化的11G2 154/155的功能拮抗作用,并且其行为与人源化的岩藻糖基化的11G2 154/155相似(即,EC₅₀=961.4pM)。

[0831] 数据证明h11G2 154/155抑制CXCL13信号传导至少与参考抗体2C9、16D7、11A7一样。实际上,h11G2比16D7(102.4%)和11A7(105.9%)在显著更大程度上抑制CXCL13信号传导(120.6%)。这些数据表明11G2抗体可以是治疗由CXCR5介导的CXCL13信号传导介导或相关的疾病、病症或病状的有用的新型治疗剂。

[0832] 实施例10:定位11G2抗体在hCXCR5上的结合位点

[0833] 通过将来自小鼠CXCR5的细胞外N末端的氨基酸移植到人CXCR5上,鉴定了CXCR5上的非岩藻糖基人源化的11G2 154/155结合位点。

[0834] 更具体地,该定位策略利用了11G2结合人CXCR5(SEQ ID NO:32)但不结合小鼠CXCR5(SEQ ID NO:34)的事实。人CXCR5(hCXCR5)和小鼠CXCR5(mCXCR5)的氨基酸序列的比对显示在图6中。下划线指示CXCR5的细胞外结构域的氨基酸残基。小鼠和人CXCR5蛋白两者

的细胞外结构域 (ECD) 在图6中以粗体表示并在每个区域的序列下标记为“N”、“L1”、“L2”和“L3”。将这些ECD在小鼠和人蛋白质之间交换,以鉴定负责11G2对人CXCR5的特异性以及与mCXCR5缺乏结合的区域。将来自小鼠CXCR5的那些区域中的每一个与人CXCR5中的相同区域交换,以产生命名为XC251、XC252、XC253、XC254、XC255和XC256的嵌合蛋白,其中人CXCR5蛋白含有指定的对应小鼠CXCR5结构域。表7提供了显示将哪些鼠标区域(m) 交换到人CXCR5中的关键之处。

[0835] 表7

[0836] (ECD交换的小鼠/人嵌合CXCR5蛋白)

[0837]

XC251	hCXCR5-mL3
XC252	hCXCR5-mL2
XC253	hCXCR5-mN
XC254	hCXCR5-mL2-mL3
XC255	hCXCR5-mN-mL3
XC256	hCXCR5-mN-mL2

[0838] 更具体地,用小鼠L3结构域交换对应的人L3结构域以产生在人CXCR5蛋白的环境中包含小鼠L3结构域的嵌合蛋白XC251 (hCXCR5-mL3)。同样,用小鼠L2交换对应的人结构域以产生嵌合蛋白XC252 (hCXCR5-mL2);用小鼠的N结构域交换对应的人N结构域以产生嵌合蛋白XC253 (hCXCR5-mN);用小鼠的L2和L3结构域交换对应的人结构域以产生嵌合蛋白XC254 (hCXCR5-mL2-mL3);用小鼠的mN和L3结构域交换对应的人结构域以产生嵌合蛋白XC255 (hCXCR5-mN-mL3);用小鼠mN和L2结构域交换对应的人结构域以产生嵌合蛋白XC256 (hCXCR5-mN-mL2)。

[0839] 评估11G2与小鼠CXCR5、人CXCR5和各种ECD交换的小鼠-人嵌合CXCR5蛋白(XC251-XC256)的结合,并将其与多种抗体(即大鼠抗小鼠CXCR5(rat)(目录MAB6198,R&D systems, Minneapolis, MN),兔抗人CXCR5(Rb)(目录,ab46218,Abcam,Cambridge, MA)、2C9、16D7的结合进行比较。结果显示在表8中。粗体数字指示抗体与蛋白质的结合。

[0840] 表8

[0841] (抗体结合ECD交换的小鼠-人CXCR5嵌合蛋白的FACS分析)

		Rb (hCXCR5) (GMFI)	rat (mCXCR5) (GMFI)	2C9 (GMFI)	16D7 (GMFI)	11G2 (GMFI)
	hCXCR5	18575	2457	117099	149936	138584
[0842]	XC251	hCXCR5-mL3	6594	3932	13287	19927
	XC252	hCXCR5-mL2	12496	3842	22383	26963
	XC254	hCXCR5-mL2-mL3	4681	3826	11446	16877
		mCXCR5	1037	12537	1183	958
	XC253	hCXCR5-mN	1549	37152	1779	1264
	XC255	hCXCR5-mN-mL3	1607	39099	1954	1341
	XC256	hCXCR5-mN-mL2	1525	31061	1966	1376

[0843] 数据显示在抗体对小鼠CXCR5具有特异性的情况下,只要嵌合体包含小鼠N结构域,其就结合ECD交换的小鼠-人嵌合CXCR5。类似地,对于结合人CXCR5的抗体(11G2、2C9、16D7和Rb),如果在嵌合体中存在人N结构域,则抗体就结合嵌合CXCR5。因此,抗体的物种特异性似乎由位于N结构域的结合所驱动。更重要的是,这些数据表明,人CXCR5的N结构域是抗体11G2、2C9和16D7的结合所必需的。

[0844] 实施例11:鉴定11G2抗体结合hCXCR5所特有的氨基酸残基

[0845] 为了更精确地确定对于抗体结合hCXCR5至关重要的特定氨基酸残基,并且为了进一步区分抗人CXCR5抗体,对CXCR5的N结构域进行了更详细的研究。更具体地,在人CXCR5的N结构域片段(根据SEQ ID NO:32编号的氨基酸1-58)中进行点突变,以产生各自包含CXCR5的对应小鼠氨基酸残基的点突变蛋白。产生表达每种突变蛋白的稳定转染子,并使用流式细胞术检查细胞的抗体结合。换言之,产生了十九个(19)人CXCR5 N结构域突变体蛋白(称为XC276-XC294),每个蛋白都包含一个氨基酸取代,其中CXCR5的人残基被对应的小鼠残基取代,如表9所示。人CXCR5突变蛋白还包含在N末端的FLAG表位(DYKDDDDK),其在表9中使用小写字母表示,以允许基于表达水平进行归一化;FLAG标签不影响抗体结合突变蛋白。在人到小鼠氨基酸残基取代本来是保守取代的情况下,通常不进行取代,并且这些残基以斜体指示。

[0846] 表9显示了与小鼠CXCR5的N区的氨基酸序列相比的hCXCR5的N区的氨基酸序列(显示了前58个氨基酸)。加下划线的是两个序列之间不同的氨基酸。该图还显示了产生的各种构建体(XC276-XC294),其中用小鼠氨基酸残基取代hCXCR5中的对应人氨基酸。例如XC276是具有单个氨基酸取代的人CXCR5,其D(人)变为G(小鼠)。hCXCR5氨基酸序列(SEQ ID NO:32)的其余部分由于没有改变而未显示。产生突变蛋白以确定哪些氨基酸残基对于抗体结合hCXCR5是至关重要的,因为所测试的抗体不结合小鼠CXCR5。

[0847]

表 9

蛋白质	按照 SEQ ID NO:32 的突变	蛋白质序列显示相对于人 CXCR5 的改变
hCXCR5	WT	MdykdddkkNYPLTLEMD--LENLEDLFWELDRDLNDYNDTSLVENHLCPATEGPLMASFKAVFVPVAY
mCXCR5		M-----NYPLTLDMGSI TYNMDDLKELAFYNSNTEIPLQDSNFCSTIVEGPLLTSFKAVFMPVAY
XC276	D10G	G
XC277	SI (插入)	SI
XC278	L11T	T
XC279	E12Y	Y
XC280	W19K	K
XC281	D22A	A
XC282	R23F	F
XC283	L24Y	Y
XC284	D25S	S
XC285	Y27S	S
XC286	N28T	T
XC287	T30I	I
XC288	S31P	P
XC289	V33Q	Q
XC290	N35S	S
XC291	H36N	N
XC292	L37F	F
XC293	P39S	S
XC294	A40T	T

[0848] 将编码每种突变体肽的核酸瞬时转染到HEK-293T细胞中。转染后2天,收获细胞并用1μg/ml抗FLAG PE (Biolegend) 或者1μg/ml或3μg/ml非岩藻糖基人源化的11G2 154/155;

2C9;S16D7或11A7,接着用抗人IgG PE (Southern Biotech,Birmingham,AL) 进行染色。使用 Accuri (BD Biosciences Franklin Lakes,NJ) 通过流式细胞术分析细胞。确定几何平均荧光强度 (gMFI), 并计算每种CXCR5抗体和抗flag的gMFI比率。

[0849] 如图7所示,所有四种抗体结合野生型人CXCR5 (XC275;WT)。然后,抗体给出结合各种点突变肽的不同模式。换言之,2C9不结合XC276 (包含突变D10G0) 或XC277 (包含氨基酸残基S和I插入到人CXCR5 N结构域中), 而11G2、16D7和11A7结合这些蛋白。这些数据表明,将这两个氨基酸插入hCXCR5序列中消除2C9结合,但不影响其他三种抗体的结合,表明2C9的表位与11G2、16D7和11A7的表位不同。更重要的是,氨基酸残基位置11处 (根据SEQ ID NO:32的序列编号) 的亮氨酸 (L) 向苏氨酸 (T) 的突变仅完全消除了11G2与XC278的结合而不影响抗体2C9、16D7或11A7与该蛋白的结合。因此,存在于位置编号11处 (相对SEQ ID NO:32中所示的氨基酸序列) 的亮氨酸残基对于11G2与人CXCR5的结合至关重要,但对于2C9、16D7或11A7与hCXCR5的结合并不重要。这些数据证明11G2的表位与那些抗体的表位不同。另外,图7显示所有四种抗体结合XC279,使得在在氨基酸残基编号12处 (相对于SEQ ID NO:32的序列) E到Y的取代对于这些抗体中任何一个与hCXCR5的结合不是至关重要的。

[0850] 这四种抗体对XC280 (XC280在氨基酸残基编号19处 (根据SEQ ID NO:32的序列编号) 包含W到赖氨酸 (K) 的取代) 的结合导致抗体16D7和11A7丧失与XC280的结合,但不影响抗体11G2和2C9与突变蛋白的结合 (图7)。这些结果进一步证明这四种抗体不结合hCXCR5上的相同表位。

[0851] 图7还显示,位置22处 (根据SEQ ID NO:32的序列编号) 的D到丙氨酸 (A) 的改变完全消除11G2与XC281突变蛋白的结合,但不影响抗体2C9、16D7和11A7的结合。这进一步强调了11G2的表位与抗体2C9、16D7和11A7的表位不同。

[0852] 所有四种抗体均相等地结合至XC285-294,并且它们的结合不受这些突变蛋白中任何氨基酸取代的影响。这些数据表明,这些位置 (27、28、30、31、33、35、36、37、39和40;请参见表9) 处的氨基酸残基不参与抗体11G2、2C9、11A7和16D7与CXCR5的抗体结合。

[0853] 因此,这些数据证明氨基酸位置编号11处的亮氨酸 (L) 残基和氨基酸位置编号22处的天冬氨酸 (D) 残基 (均相对于SEQ ID NO:32的氨基酸残基编号) 对于11G2抗体与hCXCR5的结合至关重要,因为在这些位置上这些残基中的一个 (或两个残基) 取代为对应的小鼠氨基酸残基消除了抗体与hCXCR5的结合。这些数据还显示抗体11G2与抗体2C9、16D7或11A7没有相同的表位,因为L11和/或W22的改变不影响这些抗体与hCXCR5的结合。

[0854] 图7还显示所有四种抗体结合突变体CXCR5蛋白XC282至XC284。所有四种抗体还结合蛋白XC285至XC294。这些数据表明抗体11G2、2C9、16D7和11A7的表位不在突变蛋白XC282至XC294指示的hCXCR5的N结构域的区域。

[0855] 实施例12:11G2对CXCR5具有选择性并且不结合趋化因子GPCR家族的其他成员

[0856] 使用 β -拘留蛋白偶联测定法 (DiscoverX) 针对趋化因子GPCR家族的二十 (20) 个成员评估了非岩藻糖基人源化的11G2 154/155的选择性。该测定法使用被每种受体稳定转染的全细胞,并通过检测 β -拘留蛋白与活化的GPCR的相互作用直接测量GPCR活性。由于拘留蛋白募集不依赖于G蛋白信号传导,因此这些测定法提供了通用的筛选和分析平台,几乎可用于任何Gi、Gs或Gq缀合的受体,从而提供了跨受体或受体家族的标准化高效比较 (不管G蛋白偶联)。该测定法以激动剂 (不存在配体) 和拮抗剂模式 (以EC90存在配体) 进行。选择性

组中包括以下趋化因子受体:CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、XCR1。

[0857] 当以激动剂模式测试时,在任何其他趋化因子受体上均未观察到非岩藻糖基人源化的11G2 154/155的显著活性(在200nM测试),并且其仅作为CXCR5的拮抗剂具有显著活性(92%抑制配体诱导的 β -拘留蛋白偶联),当以拮抗剂模式与评估的所有其他趋化因子受体进行比较时,即,对于所测试的任何其他趋化因子受体均未观察到显著的抑制作用。

[0858] 实施例13:h11G2没有表现出对DNA、胰岛素或LPS的多反应性

[0859] 多反应性测定法用于确定抗体是否可以在体内潜在地对各种不相关的抗原反应。缺乏多反应性表明11G2是CXCR5特异性抗体并在体内不发生结合脱靶。

[0860] 黑色DELFI A板(Thermoscientific)包被有10 μ g/ml的双链DNA(dsDNA; Millipore),5 μ g/ml的脂多糖(LPS;Sigma),10 μ g/ml胰岛素(Sigma,St.Louis,MO)或磷酸盐缓冲盐水(PBS),并在4 $^{\circ}$ C温育过夜。然后使用Biotek ELx405微孔板清洗机(Biotek, Winooski,VT)用水洗涤板,并然后在室温用200 μ l含1 \times PBS、0.05%Tween 20和1mM EDTA的测定缓冲液封闭板1小时。在另外的洗涤步骤之后,将板与抗CXCR5抗体的系列稀释液在室温温育1小时(所有抗体都是岩藻糖基化的)。为了检测,将100 μ l的DELFI A-Eu-N1-抗人IgG(50 μ g/ml;Perkin Elmer,Waltham,MA)加入板中,并在室温温育1小时。最后,将100 μ l的DELFI A增强溶液添加到每个孔中,并将板在室温摇动15分钟,然后在萤光下在VictorX4多标记板读数器(PerkinElmer,Waltham,MA)上进行读取。数据显示在表10中。

[0861] 表10

[0862] CXCR5 mAb多反应性的萤光(计数)

CXCR5 mAb	剂量(nM)	萤光(计数)			
		胰岛素包被	DNA 包被	LPS 包被	PBS 包被
人源化的 11G2 154/155	1.2	161	1099	190	1788
	11	305	1780	829	1145
	100	6090	2696	4988	2314
2C9	1.2	267	919	328	523
	11	1690	1483	4144	1408
	100	21100	13970	21447	7758
16D7	1.2	175	701	222	1874
	11	1752	1974	1889	1733
	100	4899	14356	3850	2286
11A7	1.2	614	29862	334	1669
	11	3252	75133	1521	1608
	100	31720	108952	6510	10188

[0864] 在分开的研究中,对非岩藻糖基化的人源化的11G2 154/155测试多反应性,并且未显示与胰岛素、DNA、LPS或PBS的结合,这与以上表10所示的岩藻糖基化的人源化的11G2 154/155的结果一致。

[0865] 这些数据证明11G2与胰岛素、DNA或LPS没有反应性,并且与比较物抗体2C9、16D7和11A7相比反应性低。这些数据表明11G2是潜在有用的新型治疗剂。根据定义,多反应性抗体以非特异性方式与一系列生物分子结合。11G2在通用多反应性测定法中不发生反应进一步支持11G2对CXCR5具有特异性。PK、TK和毒物数据也支持11G2对CXCR5具有特异性。

[0866] 实施例14:11G2与比较物抗体之间的差异总结

[0867] 下表11总结了本文之前其他地方描述的11G2和各种比较物抗体的特征。ND表示未确定。

[0868] 这些数据证明岩藻糖基化和非岩藻糖基化的抗体11G2均与比较物抗体2C9、16D7和11A7有很大不同。换言之,通过位置11处和22处的小鼠氨基酸残基的取代来消除11G2结合,而比较物抗体的结合不受这些残基的取代影响(根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号)。此外,2C9的结合需要存在氨基酸残基W19、D22和R23才能与hCXCR5结合,但是即使通过在位置19处(根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号)的丙氨酸取代为W消除11A7对hCXCR5的结合,也没有一个抗体需要全部这三个。与所有其他抗体不同,通过在人CXCR5的D10和L11(根据SEQ ID NO:32的氨基酸序列编号)之间插入两个小鼠残基来消除16D7与hCXCR5的结合(参见图7)。因此,本文提供的数据表明11G2不具有与抗体2C9、16D7和11A7相同的表位,并且这些抗体相互之间也具有不同的表位。

[0869] 另外,本文提供的数据证明11G2具有对hCXCR5的亲合力(7.08pM)(表示为EC₅₀)是2C9(65.59pM)的至少10倍和11A7(563.63pM)的至少100倍,与16D7有很大不同,因为16D7不饱和所以无法比较。

[0870] 表11

CXCR5 mAb	表位(结合的关键残基)	多反应性	表观亲和力(EC ₅₀ , pM)	ADCC(EC ₅₀ , pM)	功能性拮抗(EC ₅₀ , pM)
人源化的11G2 154/155	L11, D22	无	7.08	253.72	752.9
[0871] 非岩藻糖基人源化的11G2 154/155	ND	无	6.60	2.38	961.4
2C9	W19, D22, R23	无	65.59	380.31	793.1
16D7	D10, SI插入	无	不饱和的结合	2590.61	1104
11A7	W19	对DNA的反应性	563.63	4.35	1401

[0872] 这些数据全部表明11G2与比较物抗体2C9、16D7和11A7有本质区别,并且是潜在的新颖有用的治疗剂,用于治疗或预防由CXCR5的生物学活性介导或相关的疾病、病症或病况,包括但不限于CXCR5介导的CXCL13信号传导。对于11G2的非岩藻糖基化形式尤其如此,其表现出大大增强的ADCC活性,从而增加了其作为治疗例如由CXCR5的细胞表达介导或与之相关的免疫性疾病的治疗剂的潜在用途。

[0873] 实施例15:非岩藻糖基化的h11G2 XC154/XC155的体内药效学

[0874] 在体内,在针对非岩藻糖基人源化的11G2 154/155的多个食蟹猴研究中,已经探索了0.001至400mg/kg/剂量IV或SC的剂量。如在整个实验中所使用的,IV和SC制剂包含以下组分:50mg/mL本公开内容的CXCR5抗体或抗原结合片段、20mM组氨酸、8.5%蔗糖和0.02%聚山梨酯80、0.005%EDTA, pH 5.8。下表12列出了食蟹猴中非岩藻糖基化的11G2 XC154/XC155的体内研究设计。

[0875] 表12

研究描述	剂量 (施用途径)	给药方案
食蟹猴中的单剂量药效学 (PD) 研究	0.001、0.002、0.005、0.1、和 0.2 mg/kg (IV)	单剂量
食蟹猴中的重复给药探索性毒性研究 (48 周恢复阶段)	40 和 400 mg/kg/dose (IV), 260 (SC)	在第 1、8 和 15 天每周一次共三剂
[0876] 食蟹猴中的重复给药 GLP 毒性研究 (11 个月恢复阶段)	5 和 200 mg/kg/dose (IV), 20 (SC)	在第 1、15、29、43 和 57 天每两周一次共五剂
食蟹猴中的非岩藻糖基化的 h11G2 VL XC154/VH XC155 的 PK、PD、免疫能力 (疫苗回忆应答) 研究	2 和 10 mg/kg/剂量 (IV)	在第 1 天和第 8 天每周一次共两剂

[0877] 在食蟹猴中以 0.001 至 0.2 mg/kg 的单剂量非岩藻糖基化的 h11G2 VL XC154/VH XC155 (非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155) 观察到在外周血中剂量依赖性耗尽 B 细胞和 Tfh 样细胞; 最低测试剂量 (0.001 mg/kg) 导致外周血中的 B 细胞和 Tfh 样 (即 cTfh) 细胞的约 50% 耗尽。

[0878] 在食蟹猴的探索性和关键性 GLP 毒性研究中, 非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 \geq 5 mg/kg IV 的剂量导致外周血中 B 细胞和 Tfh 样细胞显著耗尽, 在脾脏和其他淋巴组织 (腋窝和肠系膜淋巴结以及与肠道相关的淋巴组织) 的淋巴滤泡细胞中细胞结构减少; 这些效果与免疫组织化学观察到的 B 细胞区域的药理学介导的细胞结构减少有关。在探索性和关键性研究中, 观察到部分至全部恢复 B 细胞、Tfh 样细胞和 Tfh 细胞。耗尽和随后的补充的动力学与非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 的暴露水平有关。

[0879] 为了确定非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 是否损害体液记忆应答, 在食蟹猴中进行了疫苗回忆应答研究。简言之, 在第 1 天和第 8 天以 2 和 10 mg/kg/剂量的水平通过 IV 推注注射给予食蟹猴 (每组 N=6) 非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155, 所述食蟹猴在研究前已经针对 TT (破伤风类毒素) 进行了免疫。非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 的施用耐受性良好, 并导致了预期的药理作用 (即循环 B 细胞和 Tfh 样细胞减少)。与第 15 天相比, 在第 22 天 (第二次 TT 免疫后的 7 天) 在所有剂量组的所有动物中均观察到免疫球蛋白 M (IgM) 和 IgG 记忆应答增加。在施用非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 (10 mg/kg/剂量) 的动物中, 这些应答减弱, 相比于对照组为 72,000, 峰值抗 TT IgG 的平均滴度为 42,667, 并且相比于对照组为 3500, 峰值抗 TT IgM 的平均滴度为 1583。Rituxan® (利妥昔单抗) (一种用作比较物的 B 细胞耗尽抗体) 不影响抗 TT IgG 记忆应答。总之, 这些数据证明非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 在体内损害体液记忆应答。

[0880] 安全药理学

[0881] 心电图和心率测量被纳入关键毒性研究的设计中。没有发现可归因于施用非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 的异常心电图检查结果。所有心电图的定性和定量均在正常限度内并没有出现心律失常。

[0882] 实施例 16: 非岩藻糖基化的 h11G2 XC154/XC155 的体内药代动力学和代谢

[0883] 在 Meso Scale **Discovery**® (MSD) 测定法平台上, 验证了电化学发光 (ECL) 测定法以检测食蟹猴血清中 ADA 的存在。在每个平板上均包括一个阳性对照、抗 CXCR5 抗独特型

抗体(加标到食蟹猴血清中)和一个阴性对照(由合并的正常食蟹猴血清组成),以监测测定法性能。将生物素标记的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155和钆标记的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155与研究样品、阳性对照和阴性对照共同温育。样品中存在的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的抗体必须与该测定法中待检测的生物素标记和钆标记形式的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155结合。通过生物素化的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155将复合物捕获到链霉抗生物素蛋白包被的MSD多阵列板中,然后在MSD Sector Imager仪器上读取。最终检测是通过使用钆标记的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155和三丙胺在MSD Sector Imager仪器内产生ECL信号(RLU)进行的。

[0884] 使用分层策略对研究样品测试ADA。最初在稀释因子为75的筛选测定法中测试样品。将产生低于测定法临界点的RLU的样品报告为阴性(<1.88)。在全稀释系列中再分析产生在测定法临界点或以上的RLU的样品,以确定抗体滴度。抗体滴度定义为产生等于临界点RLU的RLU的样品的倒数稀释度。报告该滴度的对数(以10为底)。

[0885] 关于ADA的诱导的结论是基于在研究第1天给药前收集的样品和给药后样品结果的比较而得出的。如果给药前样品测试对于ADA是阴性的,而对应的给药后样品测试是阳性的,则认为动物对于ADA的诱导是阳性的。如果给药前和给药后测试的样品对于ADA是阳性的,则仅当给药后样品滴度是至少0.48(\log_3 ,系列稀释因子)或高于给药前样品的滴度时,才认为动物对于ADA的诱导是阳性的。

[0886] 单剂量药代动力学

[0887] 作为研究的一部分,以0.001、0.002、0.005、0.1或0.2mg/kg的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155进行单次IV给药后,对非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155 PK进行了表征,以评估在雄性和雌性食蟹猴($n=1$ /性别/剂量组)中外周血B细胞和滤泡T辅助(Tfh)样(Tfh样)细胞的耗尽和补充。如在整个实验中使用的,IV和SC制剂包含以下组分:50mg/mL本公开内容的CXCR5抗体或抗原结合片段、20mM组氨酸、8.5%蔗糖和0.02%聚山梨酯80、0.005%EDTA, pH 5.8。

[0888] 单次IV给药后,全身暴露随剂量增加而增加,并且非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155 PK的特征在于低CL和低 V_{ss} ,平均值范围是约0.2至2.6mL/h/kg和0.03至0.1L/kg的剂量水平。整个剂量水平的平均 $t_{1/2}$ 值范围是约1至4天。在低剂量(0.001–0.005mg/kg),有更高CL的证据,可能是由于抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的细胞耗尽,其也可能导致非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155/CXCR5复合物的清除(Kryzanski等人,2016, J.Pharmacokinet.Pharmacodyn.43(5):513–527;Wang等人,2010,AAPS J.12(4):729–740)。在低剂量在人中可以看到类似的清除机制/非线性。如本文先前其他地方所述,观察到外周血中B细胞和Tfh样细胞的剂量依赖性耗尽,并且循环B细胞的耗尽比Tfh样细胞的耗尽更稳健。

[0889] 在食蟹猴中重复剂量毒性动力学(TK)

[0890] 在对雄性和雌性食蟹猴($n=3$ 或4/性别/剂量组),以5(IV)、20(SC)或200(IV)mg/kg每两周一次(每两周)IV或SC给药非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155后(总共5个剂量),进行TK和ADA评价,作为GLP重复剂量毒性研究的一部分。

[0891] 在从媒介物对照组中收集和分析的样品中,没有可定量浓度的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155。各个剂量组的全身暴露没有明显的性别相关差异;因此,使用雄性和雌性食

蟹猴的组合数据显示了群体平均TK参数(表13)。

[0892] 以5 (IV)、20 (SC) 或200 (IV) mg/kg每两周一次给药后,重复给药后全身暴露较高,累积比率(研究第43天/研究第1天)为约1.4至1.7。此外,IV给药后全身暴露以剂量成比例的方式增加。从11个月恢复阶段的第148天到第281天观察到5mg/kg (IV) 剂量组的恢复动物中非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的最后可定量浓度。在SC给药后,估计非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的生物利用度为至少约50%。

[0893] 分别以5 (IV)、20 (SC) 或200 (IV) mg/kg给药非岩藻糖基h11G2XC154/XC155后,ADA对非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的发生率为19% (3/16只动物)、17% (1/6只动物) 和0% (0/6只动物),并且在研究第43天,与ADA阴性动物相比,ADA阳性动物的血清浓度通常更低。应当注意,非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的循环浓度可能已经干扰了ADA的检测。

[0894] 表13

剂量 (mg/kg/周) / 途径	研究日	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (小时)	AUC ₁₆₈ (µg·h/mL)
5 (IV)	1	112	0.61	8340
	43	142	5.5	11300
20 (SC)	1	131	100	18800
	43	219	40	31600
200 (IV)	1	4610	0.25	316000
	43	5220	1.2	438000

AUC₁₆₈ = 给药后从零到 168 小时的药物浓度-时间曲线下的面积; C_{max} = 最大观察浓度; IV = 静脉; NA = 不可用; SC = 皮下; T_{max} = 到第一次发生 C_{max} 的时间。

[0896] 分布

[0897] 未针对非临床物种中的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155进行蛋白质结合和组织分布研究。单次IV给药后,食蟹猴中的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的V_{ss}范围是约0.03至0.1L/kg,这与预期的IgG有限分布是一致的(Lin等人,1999,J.Pharmacol.Exp.Ther.288(1):371-378;Mascelli等人,2007,J.Clin.Pharmacol.47(5):553-565)。

[0898] 代谢

[0899] 未使用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155进行代谢研究。与分子量高于肾小球滤过截留值的其他治疗性蛋白质相似,预计非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155主要通过分解代谢降解而代谢(Lobo等人,2004,J.Pharm.Sci.93(11):2645-2668;Mascelli等人,2007,同上;Vugmeyster等人,2012,World J.Biol.Chem.3(4):73-95)。

[0900] 药代动力学药物相互作用

[0901] 未进行体外或体内药代动力学药物相互作用研究。非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155是针对CXCR5的人源化的单克隆抗体(mAb),并且已显示其在体外而非体内调节细胞因子的释放。已经显示细胞因子调节细胞色素P450(CYP)酶和转运蛋白的表达(Lee等人,2010,Clin.Pharmacokinet.49(5):295-310;Mahmood&Green,2007,J.Clin.Pharmacol.47(12):1540-1554)。因此,用非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的处理可以潜在地影响CYP酶和转运蛋白的水平,并因此调节作为这些酶或转运蛋白底物的伴随药物的清除率。但是,在临床上观察到的其他药物在细胞因子介导的药物相互作用中的作用很小,导致共同施用的小分子药物的暴露的改变少于2倍(Huang等人,2010,Clin.Pharmacol.Ther.87(4):497-503;

Evers等人,2013,Drug Metab.Dispos.41(9):1598-1609)。因此,在不希望受任何特定理论的束缚,如果伴随药物改变靶标表达,它可以潜在地影响非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的PK。

[0902] 人药代动力学的预测

[0903] 食蟹猴中的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的PK谱对于猴中的人IgG1 mAb是典型的。因此,预计人体内预测的2分区PK参数值与典型的治疗性IgG1 mAb的PK参数值相同,并假定在整个待测剂量范围内呈线性。所使用的PK参数值与之前报道的相似(Singh等人,2015,In:Developability of Biotherapeutics:Computational Approaches,S.Kumar,Singh S.Kumar,Eds.,CRC Press)。这些参数如下:中央容积(V_c)3.2L,外围容积(V_p)2.2L,中央清除率(CL_c)0.25L/天,分配清除率(Q)0.45L/天,SC吸收速率常数(k_a)0.26 1/天和SC生物利用度60%。基于本文公开的数据,非岩藻糖基化的h11G2XC154/XC155的预测人血清半衰期为约17天。

[0904] 人有效剂量的预测

[0905] 采用基于模型的方法来表征食蟹猴血清中剂量、非岩藻糖基h11G2XC154/XC155浓度与B细胞和Tfh样细胞的调节之间的关系。随后,SBI 087(一种人源化的小型模块化免疫药物(SMIP)(与RITUXIMAB一样)结合B细胞上的CD-20并耗尽B细胞)已发布的猴和人的药代动力学/药效学(PK/PD)数据用于转化从猴到人的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的B细胞耗尽参数(Cohen等人,2016,Clin.Ther.38(6):1417-1434;Dunussi-Joannopoulos et al.,2008,Ann.Rheum.Dis.64(Suppl II):190(Abstr THU0171)。与B细胞不同,没有人的数据可用于Tfh样耗尽;因此,假定Tfh样细胞耗尽的转化与B细胞的转化相似。使用SLE患者的基线B细胞和Tfh样细胞计数(Belouski等人,2010,Cytometry B Clin.Cytom.78(1):49-58)和预测的人细胞耗尽参数,模拟了在人中非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155施用后的B细胞和Tfh样细胞耗尽动力学。

[0906] 非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的预测人有效剂量是约10至30mg(IV),并且基于以下假设:为了约8周的时间的临床疗效,血液中需要耗尽的B细胞 ≤ 1 个细胞/ μL 。第二次剂量为10至30mg IV(第1天和第29天的剂量)后的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155血清浓度如上所述进行估计,并且预测的 C_{\max} 是约5至15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,预测的针对给药间隔 τ 的浓度时间曲线下面积(AUC_{τ})是38至114 $\mu\text{g}/\text{天}/\text{mL}$ 并且预测的平均浓度(C_{av} ;以 $\text{AUC}_{\tau}/28$ 计算)是1.36至4.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0907] 实施例17:非岩藻糖基化的h11G2 XC154/XC155的毒理学研究

[0908] 在表14中概述的毒性测试研究的概述中,在一系列非临床毒性研究中评估了非岩藻糖基化的h11G2 XC154/XC155。选择静脉内(IV)或皮下(SC)施用途径是因为它们是预期的临床施用途径。如在整个实验中使用的,IV和SC制剂包含以下组分:50mg/mL本公开内容的CXCR5抗体或抗原结合片段、20mM组氨酸、8.5%蔗糖、和0.02%聚山梨酯80、0.005%EDTA,pH 5.8。如本文之前其他地方所讨论的,使用人或食蟹猴外周血单核细胞进行的研究证明非岩藻糖基h11G2XC154/XC155以相当的亲和力结合表达CXCR5的细胞,并在人和猴细胞之间类似地触发抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。同样如本文先前其他地方所证明,非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155不结合小鼠、大鼠或兔CXCR5直系同源物。因此,非临床毒性研究仅在食蟹猴中进行。

[0909] 表14

	研究 ^b	浓度或剂量	GLP 状态
	重复剂量毒性		
	探索性研究		
	在食蟹猴中非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 的 17 天静脉和皮下探索性毒性研究具有恢复	0 (IV, SC), 40 (IV), 260 (SC), 400 IV (每周一次)	否
	关键性研究		
[0910]	在食蟹猴中非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 的 2 个月静脉和皮下毒性研究具有恢复阶段	0 (IV, SC), 5 (IV), 20 (SC), 200 (IV) (每两周)	是
	其他毒性研究		
	建立非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 的免疫组织化学染色方法的初步研究	0.5-25 µg/mL	否
	在正常人和食蟹猴组织中生物素化的非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 的交叉反应性研究	1, 5 µg/mL	是
	非岩藻糖基 h11G2 XC154/XC155 体外人细胞因子释放测定法	1-1000 µg/mL 或 1-100 µg/孔 ^d	否

[0911] 表14中的缩写如下:GLP=良好实验室实施;IV=静脉内;OECD=经济合作与发展组织;PBMC=外周血单核细胞;SC=皮下。

[0912] 所有GLP研究都是在OECD数据兼容成员国的相互接受中进行的。所有的体内研究都是用雄性和雌性动物进行的。除非另有说明,否则所有剂量均表示为mg蛋白质/kg体重/剂量。以1、10、100或1000µg/mL(可溶相)测定人全血,或以1、10或100µg/孔(固相)测定人PBMC。

[0913] 在IV和SC研究中,将非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155施用给猴,每周给药多至400mg/kg/剂量(IV)17天(共3剂),或者每2周多至200mg/kg/剂量(IV)2个月(共5剂)。17天探索性猴研究包括至第352天的恢复阶段。关键性(GLP)2个月猴研究具有11个月的恢复阶段(第401天)。非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155在体外测定法中诱导细胞因子释放。这些研究中确定的靶器官是造血淋巴系统(hematolymphopoietic system)。在2个月猴研究中未观察到的不利效果水平(NOEL)是200mg/kg/剂量(IV)的最高测试剂量,在第43天C_{max}是5220µg/mL并且AUC₁₆₈是438,000µg·h/mL。

[0914] 重复剂量毒性

[0915] 用非岩藻糖基h11G2XC154/XC155在食蟹猴中进行了探索性和关键性重复剂量毒性研究。

[0916] 探索性毒性研究

[0917] 在探索性非GLP研究中施用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155,以0(IV、SC媒介物)、40(IV)、260(SC)或400(IV)mg/kg/剂量(共3个剂量)每周一次对猴(1-2性别/剂量)IV或SC

注射,然后是媒介物、40 (IV) 和400 (IV) 组 (1/性别/组) 的恢复阶段至第352天。所有动物均存活直到第17天或第352天的预定尸检时间。没有与测试物品相关的临床体征,也没有对体重、食物消耗或血清细胞因子产生影响。

[0918] 在给药阶段,从第2天或第3天开始外周血中的总B细胞、CXCR5+B细胞和循环Tfh样细胞相对于基线有所减少(分别是 $0.00x-0.02x$ 、 $0.00x-0.02x$ 和 $0.03x-0.09x$),其中第17天观察到相对于基线的最大减少。在所有剂量,耗尽的量级相似。与对照相比,在所有剂量观察到脾脏中的B细胞、CXCR5+B细胞和真正Tfh细胞数量明显减少(分别为 $0.018x-0.144x$ 、 $0.003x-0.033x$ 和 $0.037x-0.245x$)。在外周血中,观察到第2天,在 $\geq 40\text{mg/kg}$ /剂量,除一只动物外,所有动物中绝对淋巴细胞减少($0.33x-0.67x$ 基线),和在第17天,在 $\geq 40\text{mg/kg}$ /剂量,在动物中免疫球蛋白(Ig)G增加($1.11x-1.81x$ 基线)。在大多数动物中,第2天的自然杀伤(NK)细胞计数有短暂下降($0.05x-0.14x$ 基线),到第6天部分恢复到完全恢复。脾淋巴滤泡的细胞结构有中度到明显的减少;在颌下腺、腋窝和腹股沟淋巴结中,淋巴滤泡的细胞结构减少最小,并且在扁桃体中,在 $\geq 40\text{mg/kg}$ /剂量和 260mg/kg /剂量(SC)时,注射部位有显微学混合细胞浸润。免疫组织化学证明脾脏中的非剂量依赖性CD20阳性细胞和CXCR5阳性细胞减少,而在颌下腺和腹股沟淋巴结中CD20阳性细胞减少。对淋巴组织的影响与外周血中B细胞和Tfh样细胞以及总淋巴细胞的减少有关,并且与其为靶向表达CXCR5细胞的耗尽抗体的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的药理学一致。

[0919] 在恢复阶段期间,到第199天,减少的B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh样细胞外周血计数(缓慢)增加,并且在第352天恢复阶段结束时,所有动物都部分或完全恢复这些细胞类型。在恢复阶段期间,NK细胞和IgG返回到基线范围(图8A-8D)。没有与测试物品相关的显微学发现(包括脾脏和颌下腺和腹股沟淋巴结的CD20和CXCR5免疫组织化学评估),并且在脾脏中,B细胞、CXCR5+B细胞和真正Tfh细胞数与媒介物对照动物的值相似或更高,表明已完全恢复。

[0920] 在任何剂量,均未观察到对外周血或脾脏中的血清细胞因子或T细胞、T辅助细胞或T细胞毒性细胞的作用。在这项研究中没有检测到明显的抗药物抗体(ADA)。

[0921] 图8A-8D是显示食蟹猴中外周血B细胞和Tfh样细胞的耗尽和重建的图。显示了在探索性毒性研究至第352天,雄性(图8A和图8C)和雌性(图8B和图8D)中每微升血液的外周血B细胞(图8A和图8B)和Tfh样细胞(图8C和图8D)水平。B细胞定义为CD3-CD20+。Tfh样细胞定义为CD3+CD4+CD95+CXCR5+细胞和CD3+CD4+CD95+hIgG+细胞的总和,因为测试物品干扰用于免疫表型分型的CXCR5抗体。用虚线指示雄性猴(图8A,272-2503个细胞/ μL)和雌性猴(图8B,233-1700个细胞/ μL)中B细胞的历史范围。

[0922] 关键性(GLP)毒性研究

[0923] 在关键性研究中施用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155,每2周以0 (IV、SC)、5 (IV)、20 (SC) 或200 (IV) mg/kg/剂量(共5个剂量)通过IV或SC注射猴(3-8/性别/组),接着11个月的恢复阶段(第401天)。在第22天(给药阶段)和第253天(恢复阶段)分别给猴注射钥匙孔血蓝蛋白(KLH)和破伤风类毒素(TT),以分别评估初级和次级T细胞依赖性抗体应答(TDAR)。用TT免疫过动物,但在研究开始前未进行过KLH免疫。在研究开始前(基线),在第22、25、29、36、43、58、253(恢复阶段免疫之前)、256、260、267、274和281天收集血液样品并针对用于产生抗KLH-IgM、抗KLH-IgG、抗TT-IgM和抗TT-IgG进行评估。

[0924] 所有给药阶段的动物均存活直至在第58天其预定的尸检时间。没有与测试物品相关的临床体征,并且对体重、食物消耗、血浆细胞因子、凝血、临床化学、TDAR-KLH参数或心电图参数没有影响。该研究中对于雄性和雌性以5和200mg/kg/剂量IV以及20mg/kg/剂量SC,所有与非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的发现包括外周血的血液学、免疫表型分型参数的非不利和可逆改变,TDAR-TT IgG值的与剂量无关的降低,以及脾脏和/或淋巴结中显微发现和免疫表型分型改变。在恢复阶段期间,由于血液收集并发症,一个对照雌性在第330天被安乐死。所有剩余的恢复动物存活到在第401天的尸检。

[0925] 非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的血液学改变通常包括在所有剂量淋巴细胞的与剂量无关的、轻度至中度下降(0.34x-0.60x基线),最高发生在第2天并在随后的时间点发生较低,这导致在所有剂量个体动物的总白细胞计数减少(0.25x-0.59x基线)。在恢复阶段的头1到2个月内,淋巴细胞接近基线和/或对照值。第2天以200mg/kg/剂量IV并且对于个体动物在随后恢复阶段的头1到3个月内随后的时间点以5mg/kg/剂量IV和20mg/kg/剂量SC,嗜碱性粒细胞也有轻度下降(0.17x-0.50x),并且在第6天对于雌性以200mg/kg/剂量IV,有短暂地最小程度地减少的(0.79x-0.82x)红细胞量(血红蛋白、红细胞计数和血细胞比容)。

[0926] 早在第2天所有动物和剂量组中,与基线相比,外周血中与岩藻糖基h11G2 XC154/XC155有关的总B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh样细胞有显著降低(0.00x-0.56x),并持续到给药阶段结束(第58天),恢复到基线或每个子集的绝对值恢复到在恢复阶段期间第393天在以5mg/kg/剂量IV给药的动物的媒介物对照动物中观察到的值范围内(图9A-9D)。所有动物在第2天的外周血中NK细胞数量均相对于基线显著下降(0.04x-0.46x);但是,大多数动物到第6天观察到部分完全恢复,尽管某些动物在一个或多个较晚的时间点NK细胞仍低于基线水平并在恢复阶段结束时恢复到基线。在第2天,一些动物的总T细胞、T辅助细胞和T细胞毒性细胞也有短暂的减少(0.45x-0.66x);但是,大多数动物到第6天和所有动物到第36天时这些细胞群都恢复到基线水平。在任何剂量,在白介素(IL)-2、IL-6、IL-10、IL-13、干扰素(IFN)- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 方面没有非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的改变。

[0927] 在 ≥ 5 mg/kg/剂量IV和在20mg/kg/剂量SC观察到脾淋巴滤泡,以及在腋窝和肠系膜淋巴结以及与肠道相关的淋巴样组织(GALT)中淋巴滤泡的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的与剂量无关的细胞结构减少。通过免疫组织化学评估,这与脾脏中CD20+和CXCR5+细胞的淋巴滤泡性细胞结构减少有关,除了1个雄性以20mg/kg/剂量SC外;但是,由于第15天起ADA的流行,该动物中的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155暴露可能已经受到影响。此外,与媒介物对照相比,第58天尸检时脾脏中的B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh细胞数量较少。与媒介物对照相比,一些动物的脾脏中NK细胞数量更低。在第401天的恢复结束时,在施用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的所有动物中检查的每个子集的绝对值在媒介对照组动物的值范围内,表明从在研究的给药阶段期间观察到的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关较低数量恢复。

[0928] 以 ≥ 5 mg/kg/剂量IV和20mg/kg/剂量SC,脾脏和淋巴结中的淋巴滤泡中的淋巴样细胞结构减少以及脾脏中的B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh细胞的较低数量与外周血中总淋巴细胞和B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh-样细胞的减少相关。在恢复阶段结束时(第401天),在5mg/kg IV剂量组中没有与非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的显微学发现,表明已完全

恢复。这些发现与预期其耗尽表达CXCR5的细胞的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的药理学一致。外周血和/或脾脏中NK细胞的较少数量可能是由于NK效应细胞死亡,这已在抗体依赖性细胞毒性(Warren等人,2011,J.Immunol.Meth.370:86-92)和/或组织重新分布后的NK细胞中进行了描述;但是,不能排除其他机制。

[0929] 对匙孔血蓝蛋白(KLH)的初级T细胞依赖性抗体应答(TDAR)没有非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的作用。在所有组中均观察到抗KLH-免疫球蛋白(Ig)M和IgG应答。在研究之前,所有猴均已针对破伤风类毒素(TT)进行免疫接种。在所有剂量组的所有动物中均观察到IgM和IgG记忆应答增加。在免疫后第7、14、21和36天,在5IV、20SC和/或200IV mg/kg/剂量组的雄性和雌性动物中均观察到对TT的次级TDAR(IgG中心点滴度值)的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155相关的与剂量无关的降低。在免疫后7天,对于5和200mg/kg/剂量IV组,观察到组平均抗TT IgG抗体的统计学显著降低。

[0930] 在恢复阶段免疫后,在5mg/kg非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155剂量组的所有动物中1个或多个时间点均存在抗KLH IgM和IgG记忆应答,其在媒介物对照组的范围内。在恢复时间点期间,在恢复阶段接种后7天,在5mg/kg剂量组动物中观察到组抗TT-IgG中心点滴度(CPT)值的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的统计学显著降低。所有恢复阶段动物CPT值均在对照组范围内,但5mg/kg剂量组中的8只动物中有2只除外,其CPT值在直至恢复阶段中的TT免疫后28天的所有恢复时间点均低于对照组。在给药或恢复阶段,没有归因于非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155施用的抗TT IgM值的改变。

[0931] 所有组中都存在抗KLH IgM和IgG的初级应答;在初次免疫后的1个或多个时间点,5和200mg/kg/剂量组的一些动物的CPT高于对照的范围。在任何时间点,任何组中的组平均抗KLH IgM或IgG抗体均无统计学显著差异。由于个体动物的改变是偶发性的,缺乏剂量依赖性,并且组CPT值在对照动物的范围内,因此它们不被视为与非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关。在恢复时间点期间,除5mg/kg剂量组中8只动物中的1只KLH免疫后的第14、21和28天的CPT值略低于对照的范围外,所有动物均在对照的范围内。这些数据(给药或恢复阶段)证明,与对照动物相似,所有用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155给药的动物(雄性和雌性)均能够产生针对KLH免疫的初级IgM和IgG应答。

[0932] 尽管通过免疫表型检测,外周血中的总B细胞、CXCR5+B细胞、Tfh样细胞和NK细胞显著减少,并且脾脏中B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh细胞的数量显著较低,脾脏、淋巴结和GALT中淋巴细胞计数的减少和淋巴样细胞结构的减少,但是所有发现没有不利影响,因为缺乏相关的临床体征并缺乏对初级TDAR的影响。其他血液学发现包括总白细胞、嗜碱性粒细胞和红细胞参数的减少没有不利影响,因为严重程度有限并缺乏显微学相关性。在第401天,未发现非岩藻糖基h11G2XC154/XC155相关的显微学和免疫组织化学结果,表明已完全恢复。

[0933] 每隔一周SC或IV施用进行2个月,猴中的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的NOAEL为200mg/kg/剂量。NOAEL的全身暴露(C_{max} 和 AUC_{168})分别为 $5220\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $438,000\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 。在这项研究中检测到抗非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155抗体,并将数据总结在本文其他地方。在本文其他地方提供了重复剂量毒性程序中提到的靶器官毒性的风险评估。与猴中的关键应答相关的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的阈值浓度可以在本文其他地方找到。

[0934] 生殖和发育毒性

[0935] 在食蟹猴的重复剂量毒性研究中评估在雄性或雌性生殖组织中没有与测试物品相关的作用。

[0936] 局部耐受性

[0937] 尽管在体内毒性研究中宏观和微观检查了注射部位,但尚未进行用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155进行的独立局部耐受性研究。

[0938] 在探索性猴研究中,在以260mg/kg/剂量的SC注射部位中存在中度血管周围混合性白细胞浸润(单核白细胞、嗜中性粒细胞和较少的嗜酸性粒细胞),相比于对照动物的SC注射部位中最低至轻度浸润。在260mg/kg/剂量的SC雄性中,浸润多灶性扩展到小血管的肌膜。在260mg/kg/剂量的SC雌性中,几个多核巨细胞浸润皮下胶原,并且这些细胞中存在少量胞浆内的嗜碱性或嗜酸性的纤维状物质。在关键性2个月的猴研究中,IV和SC施用部位的显微学发现不认为与测试物品有关。

[0939] 抗原性

[0940] 通过在食蟹猴的重复剂量毒性研究中测量ADA水平来评估免疫原性;这些数据已在前面进行了描述。

[0941] 免疫毒性

[0942] 体外和体内研究表征了非岩藻糖基h11G2XC154/XC155对免疫系统的作用。使用2种不同的体外形式在人细胞因子释放测定法中确定了非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155诱导细胞因子(TNF- α 、IL-6和IFN- γ)释放的潜力:使用全血的可溶相测定法和使用固定化的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155和外周血单核细胞(PBMC)的固相测定法。以这些形式的每种评估了来自8位健康人供体的样品。在两种细胞因子释放测定法形式中,均观察到非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155诱导的细胞因子(TNF- α 、IL-6和IFN- γ)释放。在体内,猴重复剂量探索性和关键性毒性研究表征了体内细胞因子释放谱,以及非岩藻糖基h11G2XC154/XC155对免疫系统细胞和组织的作用。非岩藻糖基h11G2XC154/XC155在体内不诱导细胞因子。如本文其他地方所述,在施用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的猴的外周血和脾脏中观察到淋巴细胞、B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh/Tfh样细胞的耗尽,其效果与预期的CXCR5耗尽抗体的作用机制一致。在探索性和关键毒性研究的恢复阶段之后,脾脏和淋巴结中的淋巴细胞参与与媒介物对照相当。

[0943] 如本文其他地方所讨论的,在关键性2个月毒性研究中评估了分别对KLH和TT的初级和次级TDAR应答。对于对KLH的初级TDAR没有非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的影响。所有动物均产生对TT的次级TDAR应答,但在研究的给药和恢复阶段期间免疫后第7天,对于5和200mg/kg/剂量IV组在中心点滴度中观察到非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的降低。

[0944] 组织交叉反应性(TCR)

[0945] 在用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的初步染色方法研究中,进行了充分的初步方法开发工作,包括多次运行和方法。这些测定条件均没有一致地显示在预期细胞和组织中的膜染色。在GLP顺应性组织交叉反应性研究中,评估了生物素化的非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155(非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155-Bio;1和5 μ g/mL)与食蟹猴和人组织的冷冻切片的结合。食蟹猴和人组织之间的染色模式重叠。在单核细胞、网状内皮细胞、各种上皮、神经胶质细胞和/或垂体细胞中观察到对人和猴共同的染色,代表了非岩藻糖基h11G2

XC154/XC155的预期反应性(Breitfeld等人,2000,J Exp Med 192(11):1545-1552; Carlsen等人,2002,Gut 51(3):364-371;Flynn等人,2003,J.Neuroimmunol.136(1-2):84-93;Schaerli等人,2000,J.Exp.Med.192(11):1553-1562;Schmutz等人,2005,Arthritis Res.Ther.7(2):R217-R229),以及甲状腺的胶体。对于其他猴或人组织,观察到阳性非岩藻糖基h11G2XC154/XC155染色。对于人组织,观察到视神经的神经纤维和脊髓神经根神经元、前列腺的平滑肌细胞、睾丸的间质细胞以及眼睛的晶状体纤维的染色。

[0946] 仅在食蟹猴中染色的组织是骨髓中的造血前体细胞、皮肤和子宫颈的肥大细胞、脑和脊髓中的神经毡、心脏心肌细胞以及胎盘和视神经鞘中的纺锤体细胞。尽管这可能代表测试物品的出乎意料的交叉反应性,但染色本质上是细胞质的,没有微解剖学特异性,并且缺乏清晰的质膜染色。这种细胞质染色很难区分表达CXCR5的细胞和组织和非表达的细胞和组织。细胞质染色预期不会在体内被测试物品所利用,并且通常被认为具有很少甚至没有毒理学意义(Hall等人,2008,In:Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals:A Science-Based Approach to Facilitating Clinical Trials, p.208-240,Cavagnaro,J.A.,ed.,Wiley-Interscience;Leach等人,2010, Toxicol.Pathol.38(7):1138-1166)。缺少清晰的膜染色表明无法使用稳健的方法进行完整的评估。在2个月重复剂量毒性研究中缺乏不利发现,支持在离体组织交叉反应性研究中观察到的染色不会转化为体内作用。尽管进行了多种尝试来获得稳健的TCR方法,但观察到的结合并未得到超出了基于预期药理学所预期的安全性考虑。

[0947] 发现与药代动力学的关系

[0948] 在以5(IV)、20(SC)或200(IV)mg/kg/剂量每两周共2个月(共5个剂量)SC或IV施用给雄性和雌性猴后,测定非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的血清浓度。各个剂量组的全身暴露没有明显的性别相关差异;因此,使用来自雄性和雌性食蟹猴的组合数据来显示组平均TK参数。重复给药后全身暴露较高,累积比率(研究第43天/研究第1天)为约1.4至1.7。此外,IV给药后全身暴露以剂量比例的方式增加。在SC给药后,估计非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的生物利用度>50%。

[0949] 在表15中提供了与关键应答有关的非岩藻糖基h11G2XC154/XC155的阈值血清浓度和针对这些关键应答计算的暴露余量。

[0950] 表15

关键应答	剂量 (mg/kg/剂量)	C _{av} (µg/mL)	C _{max} (µg·h/mL)	暴露余量
重复剂量毒性研究				
猴 17 天毒性研究 (1-2 次/性别/剂量) - 每周一次给药 (所有发现没有不利作用)				
外周血: ↓总 B 细胞, ↓CXCR5+ B 细胞, ↓Tfh 样细胞, ↓NK 细胞; 脾脏: ↓总 B 细胞, ↓CXCR5+总 B 细胞, ↓真正 Tfh 细胞; ↓淋巴细胞; ↑IgG; 脾脏: ↓细胞结构 (滤泡 CD20 阳性细胞和 CXCR5 阳性细胞); 淋巴结和扁桃体: ↓细胞结构 (在淋巴结中: 滤泡 CD20 阳性细胞)	40 (IV)	844	1020	208
同上+, 注射位点: 血管周白细胞浸润	260 (SC)	2810	3340	692
[0951] 与 40 mg/kg/剂量相同	400 (IV)	7500	9610	1850
在猴中 2 个月毒性研究 (3-8 次/性别/剂量) - 每 2 周给药 (所有发现没有不利作用)				
外周血: ↓总 B 细胞, ↓CXCR5+ B 细胞, ↓Tfh 样细胞, ↓NK 细胞, ↓T 细胞, ↓T 辅助细胞, ↓T 细胞毒性细胞, ↓WBC, ↓淋巴细胞, ↓嗜碱性粒细胞, 脾脏: ↓B 细胞, ↓CXCR5+总 B 细胞, ↓真正 Tfh 细胞, ↓NK 细胞; 脾脏: ↓细胞结构 (卵泡 CD20+细胞和 CXCR5+细胞); 淋巴结和 GALT: ↓淋巴样细胞结构; TDAR: 次级 (记忆) 抗 TT IgG 应答	5 (IV)	67.3	142	17
同上	20 (SC)	188	219	46
同上+, ↓红细胞量	200 (IV) NOAEL	2610	5220	643

[0952] 表15中使用的缩写如下: AUC=浓度-时间曲线下面积; C_{av}=平均浓度; C_{max}=最大(平均)血浆浓度; Tfh样细胞(备选地, cTfh); CXCR5=5型趋化因子受体; GALT=肠相关淋巴组织; IgG=免疫球蛋白G; IV=静脉内; NK=自然杀伤细胞; NOAEL=未观察到不利作用水平; SC=皮下; TDAR=T细胞依赖性抗体应答; Tfh=卵泡T辅助细胞; TT=破伤风类毒素; WBC=白细胞。

[0953] 在重复剂量研究中, C_{max}值指示平均血浆浓度。通过将AUC除以取样间隔(48或168小时)来计算C_{av}值。在给药阶段即将结束时获得报告的值。

[0954] 通过将动物毒性研究中的C_{av}值除以在30mg, IV的预测人有效剂量的4.06µg/mL的预测人C_{av}来计算暴露余量。

[0955] 靶器官毒性

[0956] 基于进行的非临床研究, 将血液淋巴系统(脾脏、淋巴结、GALT、扁桃体、循环淋巴细胞、白细胞、红细胞参数、体外细胞因子释放)鉴定为潜在的靶器官/组织。在用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155进行的非关键性17天猴研究中, 这些组织中与测试物品相关的变化与关键性2个月毒性研究中观察到的变化一致。在非关键性和关键性毒性研究的恢复阶段, 所有与非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的发现都完全地或部分地恢复到基线或媒介物

对照组值。由于没有任何临床发现或机会性感染,以及由于TDAR测定法对免疫功能的影响最小,因此未将与测试物品相关的影响视为不利反应。因此,对非岩藻糖基h11G2XC154/XC155相关效果建立了在猴中200mg/kg/剂量IV的NOAEL。

[0957] 造血淋巴系统

[0958] 在食蟹猴的重复剂量毒性研究中,从研究第2天开始,在剂量 ≥ 5 mg/kg/剂量(IV)和20mg/kg/剂量(SC)观察到与非岩藻糖基h11G2XC154/XC155相关的外周血淋巴细胞减少。这些减少与观察到的总B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh样细胞减少相关,其一直持续到第57天。这些淋巴细胞亚群的减少证明到探索性毒性研究的恢复阶段结束,全部或部分恢复到基线值。从第2天开始,在 ≥ 5 mg/kg/剂量,在NK细胞、总T细胞、T辅助细胞和T细胞毒性细胞中也存在与非岩藻糖基h11G2XC154/XC155相关的降低,但在给药阶段结束时,达到了部分或完全恢复到基线值。在第6天,以200mg/kg/剂量的雌猴观察到除了外周血中的淋巴细胞群体减少外,RBC量也出现了短暂的、最小的减少。

[0959] 在 ≥ 5 mg/kg/剂量,外周血中减少的淋巴细胞群体与脾脏和淋巴结中非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关的较低的淋巴样细胞结构有关。较低的淋巴样细胞结构反映在总B细胞、CXCR5+B细胞、真正Tfh细胞和NK细胞的较低数量以及脾脏中较低的滤泡CD20+和CXCR5+细胞中。在 ≥ 5 mg/kg/剂量的淋巴结和GALT以及在 ≥ 40 mg/kg/剂量的扁桃体中观察到较低的滤泡淋巴样细胞结构。

[0960] 在探索性和关键毒性研究中的恢复阶段之后,脾脏和淋巴结中的淋巴细胞参数与媒介物对照相当。

[0961] 总B细胞、CXCR5+B细胞和Tfh/Tfh样细胞的减少与非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的预期作用机制一致,预期其耗尽表达CXCR5的细胞。外周血和脾脏中较低的NK细胞数量可能是由于效应细胞死亡,已知在ADCC后NK细胞中会发生这种效应。

[0962] 尽管在施用非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155的猴的外周血和脾脏中观察到了淋巴细胞参数的降低,但是对于对KLH的初级TDAR没有非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155相关作用。所有动物均产生对TT的次级TDAR,但在 ≥ 5 mg/kg/剂量观察到统计学上显著的降低。

[0963] 由于缺乏相关的临床体征或机会性感染,所有非岩藻糖基h11G2XC154/XC155相关发现都认为没有不利作用。非岩藻糖基h11G2XC154/XC155对外周血淋巴细胞、总B细胞、CXCR5+B细胞、Tfh样细胞和NK细胞以及初级和次级TDAR应答的效果可在临床中在人中进行监测。

[0964] 在可溶相和固相体外细胞因子释放测定法形式中,均观察到非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155诱导的细胞因子(TNF- α 、IL-6和IFN- γ)释放。由于该分子的预期药理作用,预期到了非岩藻糖基h11G2XC154/XC155诱导的细胞因子在体外释放。在探索性或关键性体内猴研究中,非岩藻糖基h11G2 XC154/XC155均不诱导细胞因子释放。在临床中很容易监测血清细胞因子和系统细胞因子释放的临床指标。

[0965] 表16

[0966] (序列)

[0967] (CDR氨基酸残基加下划线)

[0968]

名称	序列标识编号	序列
人源化的(h) 11G2 VL (XC154)	SEQ ID NO:1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVEYHGTSMLHWYQ QKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQQRKVPWTFGQGTKVEIK
h11G2 VL (XC154) CDR-L1	SEQ ID NO:2	<u>ESVEYHGTS</u>
h11G2 VL (XC154) CDR-L2	SEQ ID NO:3	<u>AASNVESG</u>
h11G2 VL (XC154) CDR-L3	SEQ ID NO:4	<u>QQRKVPWT</u>
h11G2 VL (XC153)	SEQ ID NO:5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVEYHGTSMLHWYQ QKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYFCQQRKVPWTFGQGTKVEIK
h11G2 VH (XC155)	SEQ ID NO:6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYGSTLHYWGQGLVTVSS
h11G2 VH (XC155) CDR-H1 (也是XC156)	SEQ ID NO:7	<u>GFTFTDFY</u>
h11G2 VH (XC155) CDR-H2 (也是XC156)	SEQ ID NO:8	<u>IRNKANGYT</u>
h11G2 VH (XC155) CDR-H3	SEQ ID NO:9	<u>ARVYGSTLHY</u>
h11G2 VH (XC156)	SEQ ID NO:10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRVYGSTLHYWGQGLVTVSS
h11G2 VH (XC156) CDR-H3	SEQ ID NO:11	<u>VRVYGSTLHY</u>
h11G2 VH (XC157)	SEQ ID NO:12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRVYGSTLHYWGQGLVTVSS
h41A10 VL (XC142)	SEQ ID NO:13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVNYIHWHYQKPGK APKRLIYETSRLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAT YYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK
h41A10 VL (XC142) CDR-L1	SEQ ID NO:14	<u>SSVNY</u>

[0969]

名称	序列标识编号	序列
h41A10 VL (XC142) CDR-L2	SEQ ID NO:15	<u>ETSRLASG</u>
h41A10 VL (XC142) CDR-L3	SEQ ID NO:16	<u>QQWSSNPLT</u>
h41A10 VH (XC148)	SEQ ID NO:17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSYGMSWVRQA PGKGLEWVATI SSGGTYTFYPDILKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYC CARRGEDYRGALEH HWGQGLTLTVSSA
h41A10 VH (XC147)	SEQ ID NO:18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSYGMSWVRQA PGKGLEWVATI SSGGTYTFYPDILKGRITISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYC CARRGEDYRGALEH HWGQGLTLTVSSA
h41A10 VH (XC147) CDR-H1 (与XC148相同)	SEQ ID NO:19	<u>GFTFRSYG</u>
h41A10 (XC147) CDR-H2 (与XC148相同)	SEQ ID NO:20	<u>ISSGGTY</u>
h41A10 (XC147) CDR-H3 (与XC148相同)	SEQ ID NO:21	<u>ARRGEDYRGALEH</u>
c11G2嵌合全长轻链(cLC) (大写的小鼠VL和小写的人κ恒定区) *表示终止密码子	SEQ ID NO:22	DVVVTQSPDSLAVSLGQRATISCRASESVEYHGTSLMHWY QQKPGQPPKLLIYAASN VESG VPARFSGSGSGTDFSLNIHPV EEGDIAMYFC QQSRKVPWTF GGG TKLEIK rtvaapsvfifppsdeql ksgtasvvc llnnfy preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadye khkvyacevthqglsspvtksfnrgec*
c11G2嵌合全长重链(cHC) (大写的小鼠VH和小写的人IgG1恒定区) *表示终止密码子	SEQ ID NO:23	EVKL VESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQPP GRALEWLG FIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDN SQSILY LQMNTLRAGDSATYYC VRVYGSTLHY WGQGTILT VSSastkg psvfplapssksts ggtaalgc lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpav lqssg lyslssv vtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcapell ggpsv flfppk pkdtlmsirtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhna tkpreeqn styrvvs vltvlhqdw lngkeyckvsnkalp iektiskakgqprepqv ylppsreem tknqvs ltclvkgyfypsdiavewesngqpennyk tppv lds gsgfflysk ltvdksrwq qgnvfsc svmheal hnhytqkslslspg *
c41A10嵌合轻链 *表示终止密码子	SEQ ID NO:24	QIVLTQSPAVMSASPGEKVTMTCSASS VNYIH WYQQKSGT SPKRWIY ETSRLASG V PVR FSGSGSGT SYSLT ISTME AEDAA TY Y C QQWSSNPLT FGAG TKLEL Krtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc llnnfy preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadye khkvyace vthqglsspvtksfnrgec*

[0970]

名称	序列标识编号	序列
c41A10嵌合重链 (大写的小鼠VH和 小写的人IgG1恒 定区) *表示终止密码子	SEQ ID NO:25	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFRSYGMSWVRQT PDKRLEWVATISSGGTYTFYDPILKGRITISRDNAKNTLYLQ MSNLKSEDTAMYCYCARRGEDYRGALEHWGQGTSVTVSSas tkgpsvfplapssksts ggtaalgc lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglysl ssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppapellggpsvflf ppkpkdtlmisrtpvctcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqnstyr vsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtkn qvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgn vfscsvmhealthnhytqkslspsg*
c5H7嵌合全长轻 链 (cLC) *表示终止密码子	SEQ ID NO:26	DVVVTQSPDSLAVSLGQRATISCRASESVEYHGTSLMHWY QKQPGQPPKLLIYAASNVEGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPV EEGDVSMFFCQQSRKVPWTFGGGTKLEIKrtvaapsvfifppsdeql ksgtasvvc llnfyreakvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadye khkvyacevthqglsspvtksfnrgec*
c5H7嵌合全长重 链 (cHC) (大写的小鼠VH和 小写的人IgG1恒 定区) *表示终止密码子	SEQ ID NO:27	EVKLVESGGGLVQPGDSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQPP GRALEWLG FIRNKANGYTTTEYSASVKGRFTISRDNSQSILY LQMNTLRAGDSATYYCVRVYGSTLHYWGQGTILT VSSastkg psvfplapssksts ggtaalgc lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssv vtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppapellggpsvflfppk pkdtlmisrtpvctcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqnstyrvvs vltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvs ltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfsc svmhealthnhytqkslspsg*
h11G2 (XC154) 全长链 (全部大写指示VL 和小写字母指示 Cκ)	SEQ ID NO:28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVEYHGTSLMHWYQ QKPGKAPKLLIYAASNVEGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSRKVPWTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlk sgtasvvc llnfyreakvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyek hkvyacevthqglsspvtksfnrgec
h11G2 (XC155) 全长重链 (全部大写指示VL 和小写字母指示 IgG1 Fc)	SEQ ID NO:29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGYTTTEYSASVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYGSTLHYWGQGT LTVSS astkgpsvfplapssksts ggtaalgc lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgl yslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppapellggpsv flfppkpkdtlmisrtpvctcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqnst yrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemt knqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqq gnvfscsvmhealthnhytqkslspsg
人κ恒定轻链结构 域 (Cκ)	SEQ ID NO:30	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc llnfyreakvqwkdnalqsgnsqesvteqds kdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

名称	序列标识编号	序列
人野生型 IgG1 Fc (包括C _H 1和铰链、 C _H 2和C _H 3的部分) 斜体指示野生型 LLGG效应子功能 序列 NST Asn297 N-连 接的糖基化位点	SEQ ID NO:31	astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssgl yslssvvtvpssslgtqtiyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcapellggpsv flfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyNS Tyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsree mtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrw qqgnvfscsvmhealthnhytqkslspsg
人CXCR5 (粗斜体指示 h11G2至关重要的 表位结合氨基酸 残基L11和D22)	SEQ ID NO:32	MNYPLTLEMDLENLEDFWELDRLDNYNDTSLVENHLCPA TEGPLMASFKAVFVPVAYSLIFLLGVIGNVLVLVILERHRQT RSSTETFLFHLAVADLLL FILPFAVAEGSVGWVLGTFLCKT VIALHKVNFYCSSLLACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSI HITCGTIWLVGFLALPEILFAKVSQGHNNSLPRCTFSQEN QAETHAWFTSRFLYHVAGFLLPMLVMGWCYVGVVHRLRQ AQRRPQRQKAVRVAAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLARLKA VDNTCKLNGSLPVAITMCEFLGLAHCCLNPMPLYTFAGVKF RSDLSRLLTKLGCTGPASLCQLFPSWRRSSLSESENATSLTTF
食蟹猴 CXCR5	SEQ ID NO:33	MNYPLMLEMDLENLEDFLEFDKFDNYNDTSLVENHLCPA TEGPLMASFKAVFVPVAYSLIFLLGVIGNVLVLVILERHRQT RSSTETFLFHLAVADLLL FILPFAVAEGSVGWVLGTFLCKT VIALHKVNFYCSSLLACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSI HITCGTIWLVGFLFALPEILFAKVSQAHPNNSLPRCTFSQEN QAETHAWFTSRFLYHVAGFLLPMLVMGWCYVGVVHRLRQ AQRRPQRQKAVRVAAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLRLKAV DNTCELNGSLPVAITMCEFLGLAHCCLNPMPLYTFAGVKFRS DLRLLTKLGCTGPASLCQLFPSWRKSSSLSESENATSLTTF
小鼠CXCR5	SEQ ID NO:34	MNYPLTLDMGSIYTNMDDLYKELAFYSNSTEIPLQDSNFCS TVEGPLLTSFKAVFMPVAYSLIFLLGMMGNILVLVILERHRH TRSSSTETFLFHLAVADLLL FILPFAVAEGSVGWVLGTFLCK TVIALHKINFYCSSLLACIAVDRYLAIVHAVHAYRRRLLSI HITCTAIWLAGFLFALPELLFAKVGQPHNNDSLPQCTFSQEN EAETRAWFTSRFLYHIGGFLLPMLVMGWCYVGVVHRLRQ AQRRPQRQKAVRVAAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLERLKA NSSCELSGYLSVAITLCEFLGLAHCCLNPMPLYTFAGVKFRSD LSRLLTKLGCAGPASLCQLFPNWRKSSSLSESENATSLTTF
小鼠11G2 VL	SEQ ID NO:35	DVVVTQSPDSLAVSLGQRATISCRASESVEYHGTSLMHWY QQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPV EEGDIAMYFCQQSRKVPWTFGGGKLEIK
小鼠11G2 VH	SEQ ID NO:36	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQPP GRALEWLGFI RNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNQSILY LQMNTLRAGDSATYYCVRVYGSTLHYWGQGILTIVSSA
小鼠41A10 VL	SEQ ID NO:37	QIVLTQSPAVMSASPGEKVTMTCSASSVNYIHVYQQKSGT SPKRWIYETSRLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISTMEAEDAA TYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

[0971]

名称	序列标识编号	序列
小鼠41A10 VH	SEQ ID NO:38	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFRSYGMSWVRQT PDKRLEWVATISSGGTYTFYDPDILKGRITISRDNANTLYLQ MSNLKSEDTAMYCYCARRGEDYRGALEHWGQGTSVTVSSA
小鼠5H7 VL	SEQ ID NO:39	DVVVTQSPDSLAVSLGQRATISCRASESVEYHGTSLMHWY QQKPGQPPELLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPV EEGDVSMFFCQQSRKVPWTFGGGKLEIK
小鼠5H7 VH	SEQ ID NO:40	EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQPP GRALEWLGFRNKANGYTTTEYSASVKGRFTISRDNQSILY LQMNTLRAGDSATYYCVRVYGSTLHYWGQGTILTSSA
2C9 轻链 (全部大写指示VL 并且小写字母指 示Cκ结构域)	SEQ ID NO:41	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPELLIYWASTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCHQYLSSYTFGGGKVEIKrtvaapsvflfppsdeql ksgtasvcllnfybreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstliskadye khkvyacevthqglsspvtksfnrgec*
2C9 重链 (全部大写指示 VH 并且小写字母 指示恒定区)	SEQ ID NO:42	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSTNAMNWVRQA PGKGLERVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCVTMIPFAYWGQGLVTVSSastkgpsv fplapsskstsaggtaalglvkdypfpvtvswngalstgvhtfpavlqssglyslsvvtv pssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpk dtlmisrtpvtevvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktppreeqynstyrvvsvlt vlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltc lvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsv mhealhnhtqklsislspg*
16D7 轻链	SEQ ID NO:43	DIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLHSSGKTYLYWFL QRPQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEA EDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIKrtvaapsvflfppsdeqlks gtasvcllnfybreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstliskadyekh kvyacevthqglsspvtksfnrgec*
16D7 重链 (全部大写指示VH 并且小写字母指 示恒定区)	SEQ ID NO:44	QVQLKESGPGLVAPSELSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQPPG KGLEWLGVIWGDGTTYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKV TSLTDDTAMYCYCARIVYWGQGLVTVSAastkgpsvfpplapssks tsggtaalglvkdypfpvtvswngalstgvhtfpavlqssglyslsvvtvpslgtq tyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtp evtevvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktppreeqynstyrvvsvltvlhqdwl ngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfyps diavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhn htqklsislspg*
11A7 轻链	SEQ ID NO:45	QPVLTQPPSVSKDLRQTATLTCTGNSNNVGNQGATWLQQH QGHPPKLLSYKNNNRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPE DEADYYCSAWDSSLSAWVFGGGTQLTVLGQPkaapsvflfpps eelqankatlvcldfygavtvawkadsspvkagvettpskqsnkyaassylltpeq wkshrsyscqvthegstvektvaptccs*

[0972]

[0973]

名称		序列标识编号	序列
11A7 重链		SEQ ID NO:46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQA PGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRHNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGYVVWGQGLTVTVSSastkgpsvflap sskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglysLssvvtvpsssl gtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthteppcpapellggpsvflfppkpkdtlmi srtpetcvvvdvshedpEvkfnwyvdgvevhnaktkpreeqnstyrvsvtlvhqd wlngkeykckvsnkalspapektiskakgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgf ypsdiafewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslslspg
h11G2 (XC151)	VL	SEQ ID NO:47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASESVEYHGTSLMHWYQ QKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQQRKVPWTFGQGTKVEIK
h11G2 (XC346)	VL	SEQ ID NO:48	DVQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASESVEYHGTSLMHWY QKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ QPEDFATYYCQQRKVPWTFGQGTKVEIK
h11G2 (XC347)	VL	SEQ ID NO:49	DVQVTQSPSSLSASVGDRVITTCRASESVEYHGTSLMHWY QKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ QPEDFATYYCQQRKVPWTFGQGTKVEIK
h11G2 (XC348)	VL	SEQ ID NO:50	DVQVTQSPSSLSASVGDRVITTCRASESVEYHGTSLMHWY QKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ QPEDFATYYCQQRKVPWTFGQGTKVEIK
h11G2 (XC349)	VL	SEQ ID NO:51	DIQVTQSPSSLSASVGDRVITTCRASESVEYHGTSLMHWYQ QKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQQRKVPWTFGQGTKVEIK
h11G2 (XC152)	VH	SEQ ID NO:52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGYTTEYSAPVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCVRVYGSTLHYWGQGLTVTVSSA S
h11G2 (XC350)	VH	SEQ ID NO:53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVAFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARVYGSTLHYWGQGLTVTVSS
11G2 VH (XC351)		SEQ ID NO:54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRVYGSTLHYWGQGLTVTVSS
11G2 VH (XC352)		SEQ ID NO:55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVAFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARVYGSTLHYWGQGLTVTVSS
h11G2 (XC353)	VH	SEQ ID NO:56	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVAFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRVYGSTLHYWGQGLTVTVSS
h11G2 (XC354)	VH	SEQ ID NO:57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARVYGSTLHYWGQGLTVTVSS

[0974]

名称	序列标识编号	序列
h41A10 (XC143)	VL SEQ ID NO:58	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVNYIHWHYQQKPGK APKRWIYETSRLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK
h41A10 (XC144)	VL SEQ ID NO:59	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVNYIHWHYQQKPGKA PKRLIYETSRLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY YCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK
h41A10 (XC145)	VL SEQ ID NO:60	diqltqspsslsasvgdrvititsasssvnyihwyqqkpgkapkrwiyetsrlasgvpsrfs gsgsgTdytltisslqpedfatyyccqwssnpltfggqtkveik
h41A10 (XC146)	VL SEQ ID NO:61	diqmtqspsslsasvgdrvititsasssvnyihwyqqkpgkapkriyetsrlasgvpsrfs gsgsgtdftltisslqpedfatyyccqwssnpltfggqtkveik
h41A10 (XC149)	VL SEQ ID NO:62	diqmtqspsslsasvgdrvititsasssvnyihwyqqkpgkapklliyetsrlasgvpsrfs gsgsgtdftltisslqpedfatyyccqwssnpltfggqtkveik
h41A10 (XC150)	VH SEQ ID NO:63	evqlvesggglvqpggslrIscaasgftfrsygmswvrqapgkglewvatissggtytfyp dsvkgfrtisrdnaknslylqmnsIraedtavyycarrgedyrgalehwgqgtlvtvssas
引物5' VL1	SEQ ID NO:64	ATCACGCGGCCGCTCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCT GTTGGTGCTG
引物5' VL2	SEQ ID NO:65	ATCACGCGGCCGCTCACCATGGAG(A/T)CAGACACACT CCTG(C/T)TATGGGT
引物5' VL3	SEQ ID NO:66	ATCACGCGGCCGCTCACCATGAGTGTGCTCACTCAGGT CCTGG(C/G)GTTG
引物5' VL4	SEQ ID NO:67	ATCACGCGGCCGCTCACCATGAGG(A/G)CCCCTGCTCA G(A/T)TT(C/T)TTGG(A/C)(A/T)TCTTG
引物5' VL5	SEQ ID NO:68	ATCACGCGGCCGCTCACCATGGATTT(A/T)CAGGTGCAG ATT(A/T)TCAGCTTC
引物5' VL6	SEQ ID NO:69	ATCACGCGGCCGCTCACCATGAGGT(G/T)C(C/T)(C/T)TG (C/T)T(G/C)AG(C/T)T(C/T)CTG(G/A)GG
引物5' VL7	SEQ ID NO:70	ATCACGCGGCCGCTCACCATGGGC(A/T)TCAAGATGGA GTCACA(G/T)(A/T)(C/T)(C/T)C(A/T)GG
引物5' VL8	SEQ ID NO:71	ATCACGCGGCCGCTCACCATGTGGGGA(C/T)CT(G/T)TTT (C/T)C(A/C)(A/C)TTTTTCAATTG
引物5' VL9	SEQ ID NO:72	ATCACGCGGCCGCTCACCATGGT(A/G)TCC(A/T)CA(C/G) CTCAGTTCCCTG
引物5' VL10	SEQ ID NO:73	ATCCACGCGGCCGCTCACCATGTATATATGTTTGTGTC TATTTCT
引物5' VL11	SEQ ID NO:74	ATCACGCGGCCGCTCACCATGGAAGCCCAGCTCAGCT TCTCTTCC
引物3' VL	SEQ ID NO:75	CAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTTGATTTCCAG
引物5' VH1	SEQ ID NO:76	ACTAGCGGCCGCATGAAATGCAGCTGGGTCAT(C/G)TTCT TC
引物5' VH2	SEQ ID NO:77	ACTAGCGGCCGCATGGGATGGAGCT(A/G)TATCAT(C/G)(C/ T)TCT
引物5' VH3	SEQ ID NO:78	ACTAGCGGCCGCATGAAG(A/T)TGTGGTTAACTGGGTTT TTT

名称	序列标识编号	序列
引物 5' VH4	SEQ ID NO:79	ACTAGCGGCCGCATG(A/G)ACTTTGGG(C/T)TCAGCTTG(A/G)TTT
引物 5' VH5	SEQ ID NO:80	ACTAGCGGCCGCATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTCTT
引物 5' VH6	SEQ ID NO:81	ACTAGCGGCCGCATGGCTGTC(C/T)T(G/A)G(C/G)GCT(G/A)CTCTTCTGC
引物 5' VH7	SEQ ID NO:82	ACTAGCGGCCGCATGG(A/G)ATGGAGC(G/T)GG(A/G)TCTT T(C/A)TCTT
引物 5' VH8	SEQ ID NO:83	ACTAGCGGCCGCATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
引物 5' VH9	SEQ ID NO:84	ACTAGCGGCCGCATGG(A/C)TTGGGTGTGGA(A/C)CTTGC TATTCCTG
引物 5' VH10	SEQ ID NO:85	ACTAGCGGCCGCATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
引物 5' VH11	SEQ ID NO:86	ACTAGCGGCCGCATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCTG
引物 5' VH12	SEQ ID NO:87	ACTAGCGGCCGCATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
引物 3' VH	SEQ ID NO:88	GGGGGTGTCGTCGACGCTG(A/C)(G/A)GAGAC(G/A)GTGA
人 IgG1 恒定区	SEQ ID NO:89	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
人 κ 轻链恒定区 (Cκ)	SEQ ID NO:90	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
具有 JH4 片段的人 DP-54 VH 种系显示框架区 (VH3 亚类)	SEQ ID NO:91	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGQGLTIVTSS
JH4	SEQ ID NO:92	WGQGLTIVTSS
具有 JK4 片段的人 VL 种系 DPK9 框架 (VKI 亚类)	SEQ ID NO:93	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
JK4	SEQ ID NO:94	FGGGTKVEIK

[0975]

[0976]

名称	序列标识编号	序列
编 码 h11G2 VL (XC154)的核酸序列	SEQ ID NO:95	ACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGAGCGCTT CCGTGGGAGATAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCG AGTCCGTGGAGTACCACGGCACCAGCCTGATGCACTGGT ACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCT ACGCCGCCAGCAACGTGGAGAGCGGCGTGCCTAGCAGA TTCAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC ATTAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACT GTCAGCAGAGCAGGAAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGGTTCGAGATCAAG
编 码 h11G2 VH (XC155) 的核酸序列	SEQ ID NO:96	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCG GCTTACCTTTACCGACTTCTACATGAGCTGGGTGAGGCA GGTCCCAGCAAGGACTGGAGTGGGTGGGTTTCATCAG GAACAAGGCCAACGGCTACACCACCGAGTATAGCGCCTC CGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCA AGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCG AGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGTACGGCA GCACACTGC ACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCG TGAGCAGCGCG
编 码 h11G2 (XC154) 全长轻链 (LC) 的核酸序列 小写字母指示恒定结构域	SEQ ID NO:97	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGAGCGCT TCCGTGGGAGATAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGC GAGTCCGTGGAGTACCACGGCACCAGCCTGATGCACTGG TACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATC TACGCCGCCAGCAACGTGGAGAGCGGCGTGCCTAGCAGA TTCAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC ATTAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACT GTCAGCAGAGCAGGAAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGGTTCGAGATCAAGGcgtacgggtgctcaccatctgtttc ttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataactc tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactccca ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgac gctgagcaaacgagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccatcagggc ctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgttag

[0977]

名称	序列标识编号	序列
编 码 h11G2 (XC155) 全长重 链 (HC)的核酸序 列 小写字母指示恒 定结构域	SEQ ID NO:98	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTTACCGACTTCTACATGAGCTGGGTGAGGCAAGGCTCCCAGCAAGGACTGGAGTGGGTGGGTTTCATCAGGAACAAGGCCAACGGCTACACCACCGAGTATAGCGCCTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCGCCAGAGTGTACGGCAGCACACTGCACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCgcgtcgaccaaggcccatcggtcttccccctggcacctcctccaagacacctctggggcacagcggccctgggctgctgtgtaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcggccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccctgcccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtgacaagaagttgagcccaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaaactctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagcgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaacaagcaggtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaagccctccagccccatcgagaaaaccttccaagcacaaggcagccccgagaaaccaggtgtacacctgccccatccccgggaggagatgacaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaggcttctatcccagcagatcgcctggagtgaggagcaatggcagccggagaaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctcttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagacctctcctgtccccgggtga
编 码 人 野 生 型 IgG1 Fc 的 核 酸 序 列	SEQ ID NO:99	gcgtcgaccaaggcccatcggtcttccccctggcacctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgctgtcaaggacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcagcggcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtctacagtctcaggactctactccccagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagctgggcacccagacctatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaagttgagcccaatcttgtagcaaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaaactctgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctccagccccatcgagaaaaccttccaagcacaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctatcccagcagatcggcgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgctcccgtgctgactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagacctctcctgtccccgggtga

名称	序列标识编号	序列
[0978] 编码人野生型 κ 恒定结构域(C κ)的核酸序列	SEQ ID NO:100	cgtacgggtggctgcaccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaac tgctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtg gataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggac agcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaa gtctacgcctggaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacag gggagagtgttag

[0979] 尽管已经参考各种应用、方法、试剂盒和组合物描述了所公开的教导,但是应当理解,在不脱离本文的教导和以下要求保护的发明的情况下,可以进行各种改变和修改。提供前述实施例以更好地说明所公开的教导,并且无意于限制本文所呈现的教导的范围。尽管已经根据这些示例性实施方案描述了本教导,但是本领域技术人员将容易理解,可以对这些示例性实施方案进行各种变型和修改而无需过多的实验。所有这些变型和修改都在当前教导的范围内。

[0980] 本文引用的所有参考文献,包括专利、专利申请、论文、教科书等,以及其中尚未引用的参考文献,出于所有目的,均通过引用全文并入本文。如果一个或多个所结合的文献和类似材料与本申请不同或矛盾,包括但不限于所定义的术语、术语用法、所描述的技术等,则以本申请为准。

[0981] 对本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的范围或精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和变型。通过考虑本文公开的本发明的说明书和实践,本发明的其他实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。说明书和实施例仅被认为是示例性的,本发明的真实范围和精神由所附权利要求书指示。

序列表

- <110> 辉瑞大药厂
加利福尼亚大学董事会
- <120> 抗CXCR5抗体及其组合物和用途
- <130> W2023-706501
- <140> 与此同时
- <141> 与此同时
- <150> 62/593,830
- <151> 2017-12-01
- <150> 62/732,985
- <151> 2018-09-18
- <160> 100
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成构建体
- <400> 1

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	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	His
			20					25					30		
Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
			35				40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
			50				55					60			
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70					75					80
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg
					85					90					95
Lys	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
					100			105						110	

- <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 2
 Glu Ser Val Glu Tyr His Gly Thr Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 3
 Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 4
 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 5
 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 Glu Ser Val Glu Tyr His
 20 25 30
 Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65	70	75	80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg			
	85	90	95
Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

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 Thr Asp Phe			
	20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala			
	50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85	90	95
Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr	
1	5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 8
 Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr
 1 5
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 9
 Ala Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 10
 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 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 11
 Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 12
 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 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile
 20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45
Glu Thr Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr 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 Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

Ser Ser Val Asn Tyr
1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

Glu Thr Ser Arg Leu Ala Ser Gly
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 17
 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 Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg Gly Glu Asp Tyr Arg Gly Ala Leu Glu His Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120
 <210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 18
 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 Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu

50		55		60	
Lys Gly Arg Ile Thr	Ile Ser Arg Asp Asn Ala	Lys Asn Ser 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 Arg Gly Glu	Asp Tyr Arg Gly Ala	Leu Glu His Trp Gly Gln			
	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr	Val Ser Ser Ala				
	115		120		

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 19
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly
 1 5
 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 20
 Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr
 1 5
 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 21
 Ala Arg Arg Gly Glu Asp Tyr Arg Gly Ala Leu Glu His
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 218
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Gly Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
<210> 24			
<211> 213			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 24			
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Val Met Ser Ala Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile			
	20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr			
	35	40	45
Glu Thr Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser			
	50	55	60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu			
65	70	75	80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr			
	85	90	95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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
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> 25		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 25		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr		
20	25	30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu		
50	55	60
Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Ser Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Arg Gly Glu Asp Tyr Arg Gly Ala Leu Glu His Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		

145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445

Gly

<210> 26

<211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 26
 Asp Val Val Val Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr His
 20 25 30
 Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Gly Asp Val Ser Met Phe Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95
 Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 27

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 27

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Gly Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290	295	300
Val Ser Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	325	330
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		335
	340	345
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	355	360
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		365
	370	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	405	410
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	420	425
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	435	440
		445
<210> 28		
<211> 218		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 28		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr His		
	20	25
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
	35	40
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ser		
	50	55
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg		
	85	90
Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		

100	105	110	
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
115	120	125	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
130	135	140	
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
145	150	155	160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
165	170	175	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
180	185	190	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
195	200	205	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210> 29			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<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 Phe Thr Phe Thr Asp Phe			
20	25	30	
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala			
50	55	60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			

130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
	165	170
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
	180	185
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
	195	200
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	245	250
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	260	265
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	275	280
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	325	330
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	340	345
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	355	360
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	405	410
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	420	425
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 30

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

<210> 31

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 372

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp

1	5	10	15
Leu Phe Trp Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu			
	20	25	30
Val Glu Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala Ser			
	35	40	45
Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile Phe Leu Leu			
	50	55	60
Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile Leu Glu Arg His Arg			
65	70	75	80
Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala			
	85	90	95
Asp Leu Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser			
	100	105	110
Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu			
	115	120	125
His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ala			
	130	135	140
Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His			
145	150	155	160
Arg Arg Leu Leu Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val			
	165	170	175
Gly Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val Ser Gln			
	180	185	190
Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn			
	195	200	205
Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val			
	210	215	220
Ala Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly			
225	230	235	240
Val Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln Lys			
	245	250	255
Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu Cys Trp			
	260	265	270
Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys			
	275	280	285
Ala Val Asp Asn Thr Cys Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile			
	290	295	300
Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met			
305	310	315	320

Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe
 340 345 350
 Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser
 355 360 365
 Leu Thr Thr Phe
 370
 <210> 33
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 33
 Met Asn Tyr Pro Leu Met Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Phe Leu Glu Phe Asp Lys Phe Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu
 20 25 30
 Val Glu Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala Ser
 35 40 45
 Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile Phe Leu Leu
 50 55 60
 Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile Leu Glu Arg His Arg
 65 70 75 80
 Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala
 85 90 95
 Asp Leu Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser
 100 105 110
 Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu
 115 120 125
 His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ala
 130 135 140
 Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Leu Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val
 165 170 175
 Gly Phe Leu Phe Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val Ser Gln
 180 185 190

Ala His Pro Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn
 195 200 205
 Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val
 210 215 220
 Ala Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly
 225 230 235 240
 Val Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln Lys
 245 250 255
 Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu Cys Trp
 260 265 270
 Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Val Arg Leu Lys
 275 280 285
 Ala Val Asp Asn Thr Cys Glu Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile
 290 295 300
 Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met
 305 310 315 320
 Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe
 340 345 350
 Pro Ser Trp Arg Lys Ser Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser
 355 360 365
 Leu Thr Thr Phe
 370
 <210> 34
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 34
 Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Asp Met Gly Ser Ile Thr Tyr Asn Met
 1 5 10 15
 Asp Asp Leu Tyr Lys Glu Leu Ala Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Glu Ile
 20 25 30
 Pro Leu Gln Asp Ser Asn Phe Cys Ser Thr Val Glu Gly Pro Leu Leu
 35 40 45
 Thr Ser Phe Lys Ala Val Phe Met Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile Phe
 50 55 60

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

370

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

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

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 36

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Gly Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala
 115 120
 <210> 37
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 37
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Val Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Thr Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105
 <210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

	35		40		45												
Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Phe	Tyr	Pro	Asp	Ile	Leu		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65						70				75				80			
Leu	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90				95				
Ala	Arg	Arg	Gly	Glu	Asp	Tyr	Arg	Gly	Ala	Leu	Glu	His	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala									
	115							120									

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 39

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

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 40

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

<210> 41

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 41

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 42
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Asn
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Thr Met Ile Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 43

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 43

```

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

```

<210> 44

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 44

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Thr Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 100 105 110
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 290 295 300
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

305	310	315	320
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	325	330	335
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
	340	345	350
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	355	360	365
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	370	375	380
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
385	390	395	400
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	405	410	415
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
	420	425	430
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	
<210> 45			
<211> 216			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 45			
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Lys Asp Leu Arg Gln			
1	5	10	15
Thr Ala Thr Leu Thr Cys Thr Gly Asn Ser Asn Asn Val Gly Asn Gln			
	20	25	30
Gly Ala Thr Trp Leu Gln Gln His Gln Gly His Pro Pro Lys Leu Leu			
	35	40	45
Ser Tyr Lys Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser			
50	55	60	
Ala Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Ser Ser Leu			
	85	90	95
Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln			
	100	105	110
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu			

115	120	125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr	Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr	
130	135	140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys		
145	150	155
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr		
165	170	175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His		
180	185	190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys		
195	200	205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210	215	
<210> 46		
<211> 441		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 46		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn		
20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
65	70	75
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Gly Tyr Val Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
100	105	110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
130	135	140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		

145	150	155	160
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	165	170	175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
	180	185	190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	195	200	205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	210	215	220
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
225	230	235	240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
	260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	275	280	285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
305	310	315	320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
	340	345	350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
385	390	395	400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
	420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	
<210> 47			
<211> 111			

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 47

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	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	His
			20					25					30		
Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
			35				40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
			50				55					60			
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70					75					80
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg
					85					90				95	
Lys	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
					100					105				110	

<210> 48

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 48

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

	100	105	110
<210>	49		
<211>	111		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	49		
Asp Val Gln Val 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 Glu Ser Val Glu Tyr His			
	20	25	30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg			
	85	90	95
Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110
<210>	50		
<211>	111		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	50		
Asp Val Gln Val 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 Glu Ser Val Glu Tyr His			
	20	25	30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80

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

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

<210> 51

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

Asp Ile Gln Val 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 Glu Ser Val Glu Tyr His
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 52

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala

50	55	60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		110
	115	120

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe		
	20	25
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40
Ala Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala		
	50	55
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser		
65	70	75
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		110
	115	

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 54

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 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 55

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 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 56

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 Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Tyr Gly Ser Thr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 57

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 Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Thr Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr 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 Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 60

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 60

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

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 61

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile			
	20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr			
	35	40	45
Glu Thr Ser Arg 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 Ser Asn Pro Leu Thr			
	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 62

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile			
	20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
	35	40	45
Glu Thr Ser Arg 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 Ser Asn Pro Leu Thr			
	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	

<210> 63

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 63

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 Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg Gly Glu Asp Tyr Arg Gly Ala Leu Glu His Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120

<210> 64

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 64

atcacgcggc cgcctcacca tgaagttgcc tgtaggctg ttggtgctg 49

<210> 65

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> misc_feature

<222> (26) .. (26)

<223> n可为a或t

<220>

<221> misc_feature

<222> (41) .. (41)

<223> n可为c或t
 <400> 65
 atcacgcggc cgcctcacca tggagncaga cacactcctg ntatgggt 48
 <210> 66
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45) .. (45)
 <223> n可为c或g
 <400> 66
 atcacgcggc cgcctcacca tgagtgtgct cactcaggtc ctgngttg 49
 <210> 67
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26) .. (26)
 <223> n可为a或g
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38) .. (38)
 <223> n可为a或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (41) .. (41)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46) .. (46)
 <223> n可为a或c
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (47) .. (47)
<223> n可为a或t
<400> 67
atcacgcggc cgcctcacca tgaggncccc tgctcagntt nttggnmtct tg 52
<210> 68
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (28) .. (28)
<223> n可为a或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (41) .. (41)
<223> n可为a或t
<400> 68
atcacgcggc cgcctcacca tggatttnca ggtgcagatt ntcagcttc 49
<210> 69
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (27) .. (27)
<223> n可为g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (29) .. (29)
<223> n可为c或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (30) .. (30)
<223> n可为c或t
<220>

<221> misc_feature
 <222> (33) .. (33)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35) .. (35)
 <223> n可为g或c
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38) .. (38)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40) .. (40)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44) .. (44)
 <223> n可为g或a
 <400> 69
 atcacgcggc cgcctcacca tgaggtncnn tgtnagntn ctgngg 46
 <210> 70
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26) .. (26)
 <223> n可为a或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43) .. (43)
 <223> n可为g或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44) .. (44)
 <223> n可为a或t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45) .. (45)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46) .. (46)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (48) .. (48)
 <223> n可为a或t
 <400> 70
 atcacgcggc cgcctcacca tgggentcaa gatggagtca cannnncngg 50
 <210> 71
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (29)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32) .. (32)
 <223> n可为g或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36) .. (36)
 <223> n可为c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38) .. (38)
 <223> n可为a或c
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39) .. (39)

<223> n可为a或c
<400> 71
atcacgcggc cgcctcacca tgtgggganc tntttncmnt ttttcaattg 50
<210> 72
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> n可为a或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (29) .. (29)
<223> n可为a或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (32) .. (32)
<223> n可为c或g
<400> 72
atcacgcggc cgcctcacca tggtnccnc anctcagttc ctg 44
<210> 73
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 73
atccacgcgg cgcctcacc atgtatatat gtttgttgtc tatttct 47
<210> 74
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 74
atcacgcggc cgcctcacca tggaagcccc agctcagett ctcttcc 47

<210> 75
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 75
 cagttgggtgc agcatccgta cgtttgattt ccag 34
 <210> 76
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33) .. (33)
 <223> n可为c或g
 <400> 76
 actagcggcc gcatgaaatg cagctgggtc atnttcttc 39
 <210> 77
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26) .. (26)
 <223> n可为a或g
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33) .. (33)
 <223> n可为c或g
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34) .. (34)
 <223> n可为c或t
 <400> 77

actagcggcc gcatgggatg gagctntatc atmntct 37
<210> 78
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223> n可为a或t
<400> 78

actagcggcc gcatgaagnt gtggttaaac tgggtttttt 40
<210> 79
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (16) .. (16)
<223> n可为a或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> n可为c或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (34) .. (34)
<223> n可为a或g
<400> 79

actagcggcc gcatgnactt tgggntcagc ttgnttt 37
<210> 80
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 80
actagcggcc gcatggactc caggctcaat ttagttttcc tt 42
<210> 81
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (22) .. (22)
<223> n可为c或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (24) .. (24)
<223> n可为g或a
<220>
<221> misc_feature
<222> (26) .. (26)
<223> n可为c或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (30) .. (30)
<223> n可为g或a
<400> 81
actagcggcc gcatggctgt cntngngctn ctcttctgc 39
<210> 82
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (17) .. (17)
<223> n可为a或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)

<223> n可为g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (28) .. (28)
<223> n可为a或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (34) .. (34)
<223> n可为c或a
<400> 82
actagcggcc gcatggnatg gagcnggntc tttntctt 38
<210> 83
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 83
actagcggcc gcatgagagt gctgattctt ttgtg 35
<210> 84
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (17) .. (17)
<223> n可为a或c
<220>
<221> misc_feature
<222> (29) .. (29)
<223> n可为a或c
<400> 84
actagcggcc gcatggnttg ggtgtgganc ttgctattcc tg 42
<210> 85
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<400> 85
actagcggcc gcatggattt tgggctgatt tttttattg 39
<210> 86
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 86
actagcggcc gcatgggcag acttacattc tcattcctg 39
<210> 87
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 87
actagcggcc gcatgatggt gttaagtctt ctgtacctg 39
<210> 88
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> (20) .. (20)
<223> n可为a或c
<220>
<221> misc_feature
<222> (21) .. (21)
<223> n可为g或a
<220>
<221> misc_feature
<222> (27) .. (27)
<223> n可为g或a
<400> 88

gggggtgtcg tcgacgctgn ngagacngtg a 31

<210> 89

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 89

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

	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325	330	

<210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 90

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

<210> 91

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 91

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
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 92

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 93

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 Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 94

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 95

<211> 332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 95

acatccagat gaccagagc cttccagcc tgagcgttc cgtgggagat agggtagacca 60
 tcacctgcag ggccagcgag tccgtggagt accacggcac cagcctgatg cactggtacc 120
 agcagaagcc cggcaaggcc cccaagctgc tgatctacgc cgccagcaac gtggagagcg 180
 gcgtgcctag cagattcagc ggcagcggaa gcggcaccga cttcacctg accattagca 240
 gcctgcagcc cgaggacttc gccacctact actgtcagca gagcaggaag gtgccctgga 300
 ccttcggcca gggcaccaag gtcgagatca ag 332

<210> 96

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 96

gaggtgcagc tggaggagag cggaggagga ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgcgccg ccagcggett cacctttacc gacttctaca tgagctgggt gaggcaggct 120
 cccggcaaag gactggagtg ggtgggtttc atcaggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gagtatagcg cctccgtgaa gggcaggttc accatcagca gggacaacgc caagaacagc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgagggcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccaga 300
 gtgtacggca gcacactgca ctactggggc cagggcacc tggtagaccgt gagcagcgcg 360
 <210> 97
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 97
 gacatccaga tgaccagag cccttcagc ctgagcgctt ccgtgggaga tagggtgacc 60
 atcacctgca gggccagcga gtccgtggag taccacggca ccagcctgat gcaactggtac 120
 cagcagaagc ccggcaaggc cccaagctg ctgatctacg ccgccagcaa cgtggagagc 180
 ggcgtgccta gcagattcag cggcagcggg agcggcaccg acttcaccct gaccattagc 240
 agcctgcagc ccgaggactt cgccacctac tactgtcagc agagcaggaa ggtgccctgg 300
 accttcggcc agggcaccaa ggtcgagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcacctga cgctgagcaa agcagactac gaaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttag 657
 <210> 98
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 98
 gaggtgcagc tggtagagag cggaggagga ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgcgccg ccagcggctt cacctttacc gacttctaca tgagctgggt gaggcaggct 120
 cccggcaaag gactggagtg ggtgggtttc atcaggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gagtatagcg cctccgtgaa gggcaggttc accatcagca gggacaacgc caagaacagc 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgagggcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccaga 300
 gtgtacggca gcacactgca ctactggggc cagggcacc tggtagaccgt gagcagcgcg 360
 tcgaccaagg gcccacgggt ctccccctg gcacctctct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcttaca gtctctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccc aaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 780
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcacc tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
 aagagcctct ccctgtcccc gggttga 1347

<210> 99

<211> 990

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 99

gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccgaccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggtcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgetccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc cccgggttga 990

<210> 100

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 100

```
cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttag 324
```

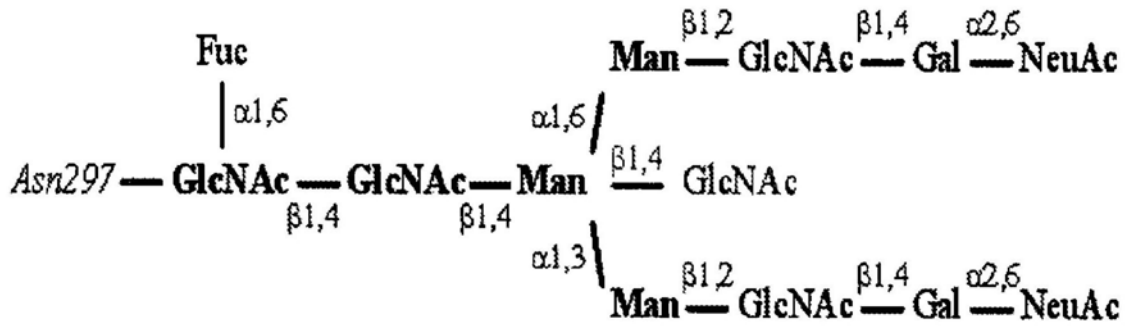
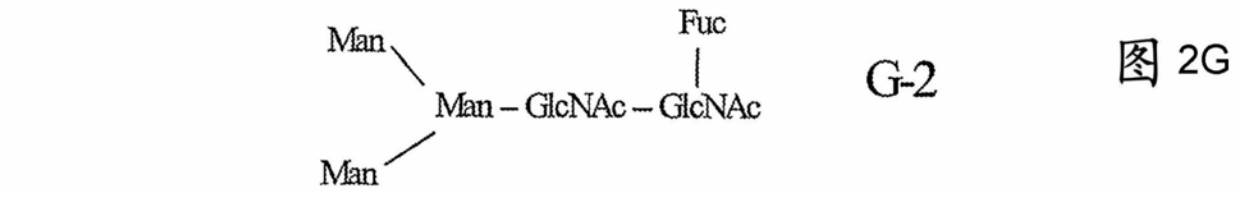
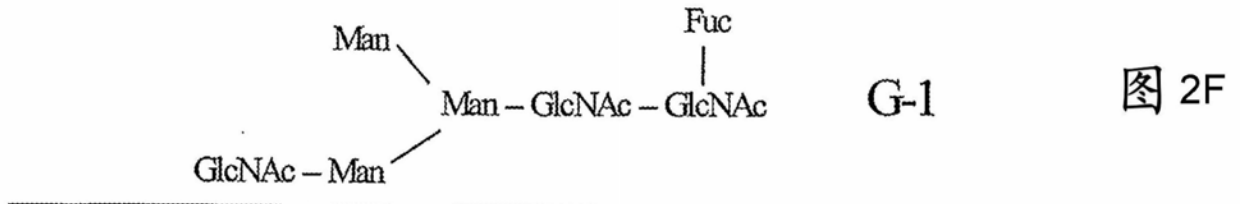
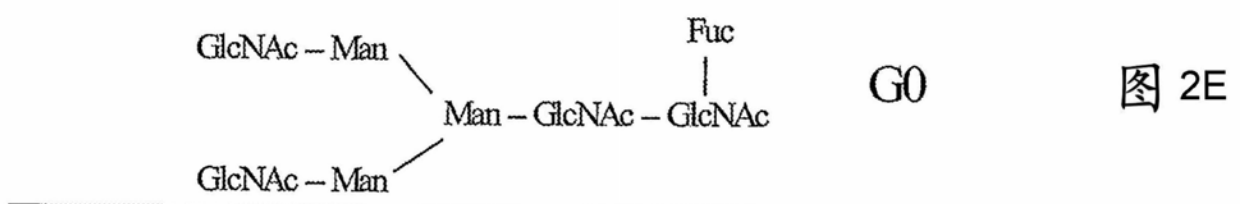
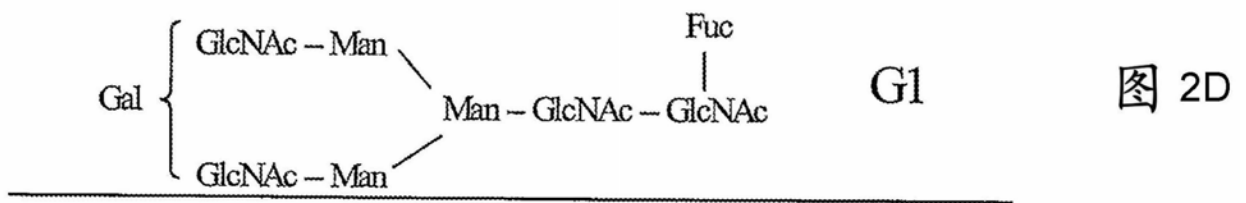
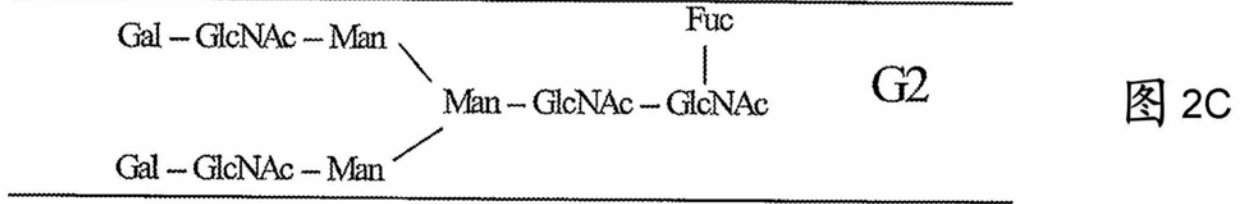
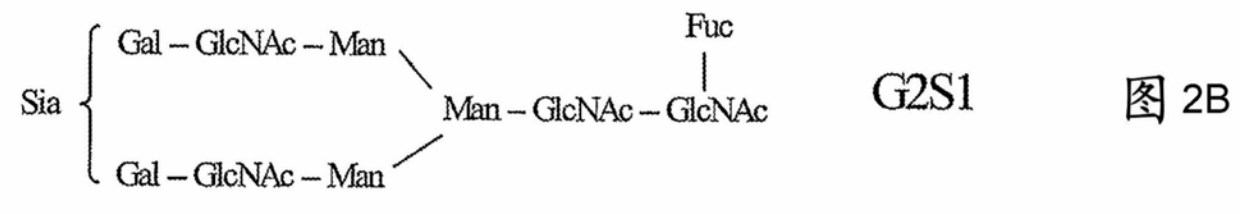
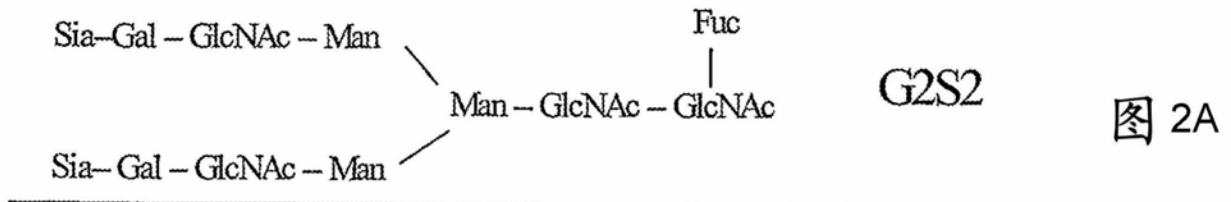


图1



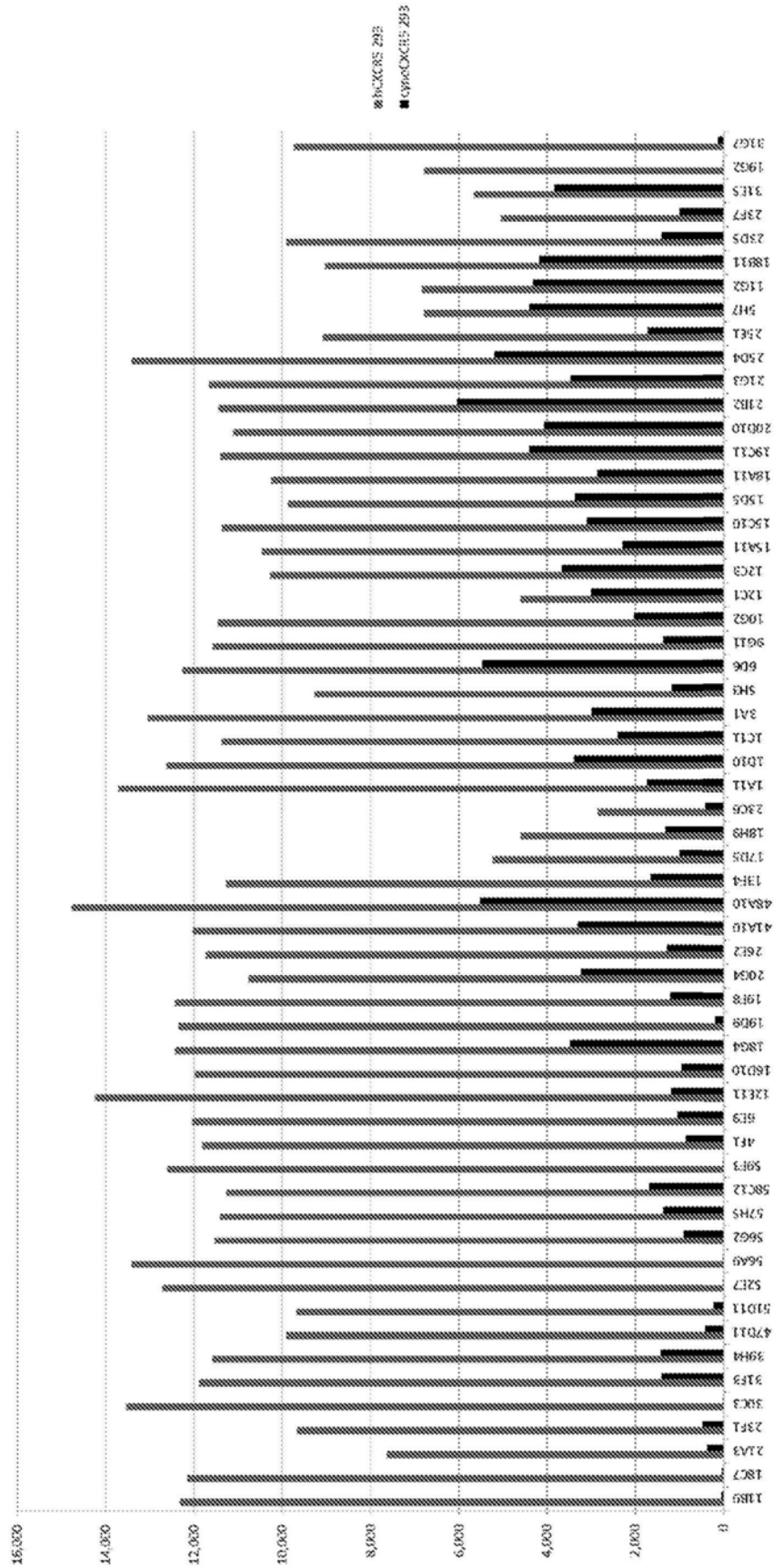


图3

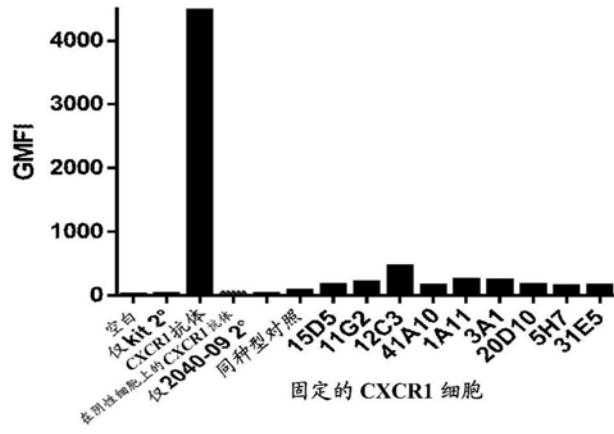


图4A

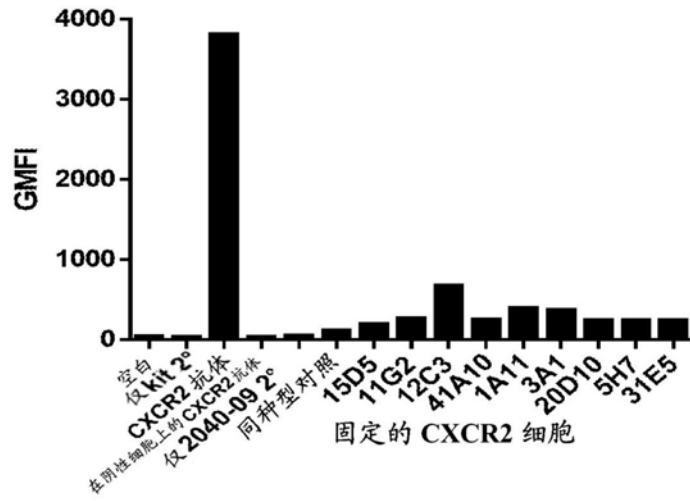


图4B

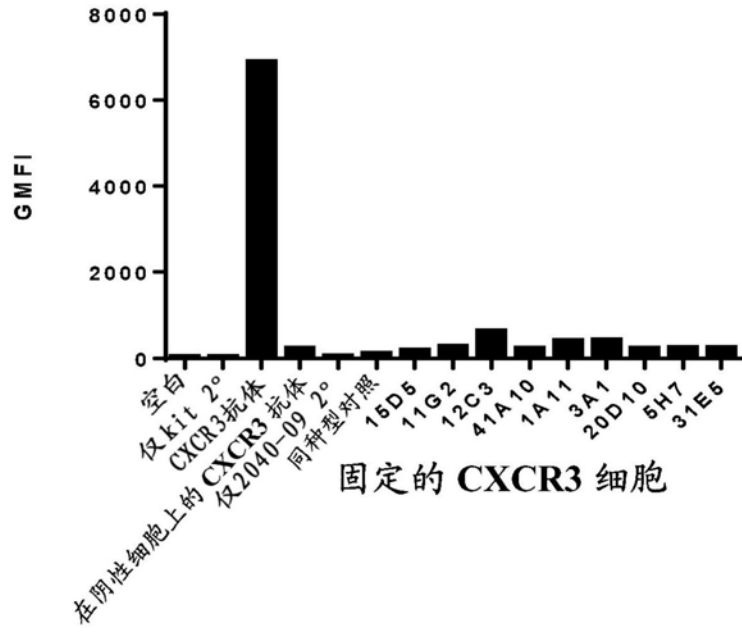


图4C

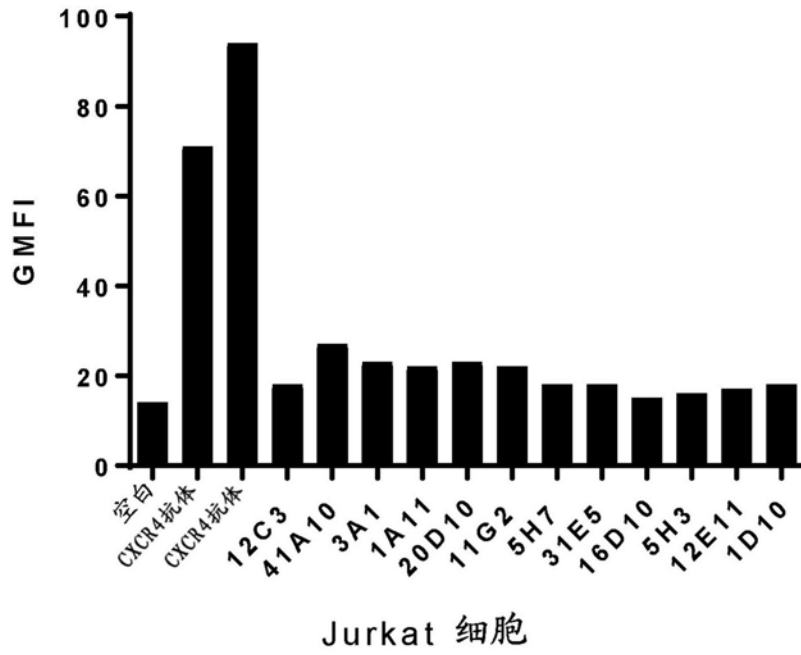


图4D

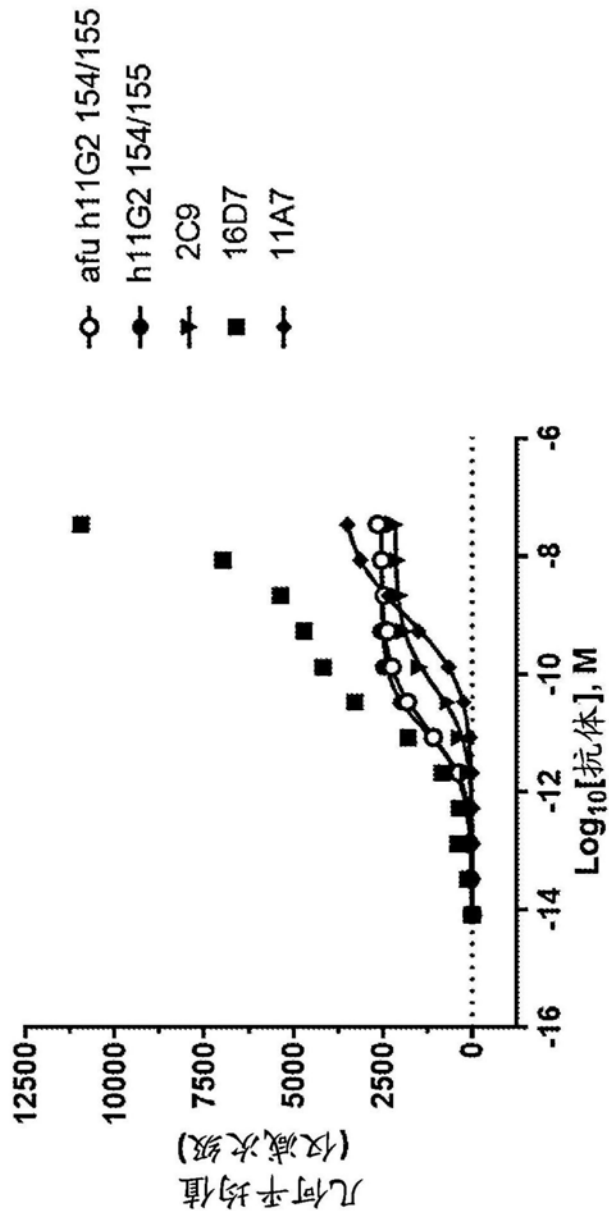


图5

h MNYPLTLEMD--LENLEDFWELDRLDNYNDTSLVENHLCPATEGPLMASFKAVFVFPVAY
 m MNYPLTLDMGSI TYNMDDLYKELAFYSNSTEIPLODSNFCSTVEGPLLTSFKAVFMPVAY

N

SLIFLLGVIGNVLVILERHRQRSSSTETFLFHLAVADLLLVFILPFAVAEGSVGWVLG
 SLIFLLGMMGNILVILERHRHTRSSTETFLFHLAVADLLLVFILPFAVAEGSVGWVLG

L1

TFLCKTVIALHKVNFYCSSLLLACIAVDRYLAI VHAVHAYRRRLLSIHITCGTIWLVG
TFLCKTVIALHKINFYCSSLLLACIAVDRYLAI VHAVHAYRRRLLSIHITCTAIWLAGF

L1

LLALPEILFAKVSQGHNNSLPRCTFSQENQAEHAWFTSRFLYHVAGFLLPMLVMGWCY
 LFALPELFAKVGQPHNNDSLPQCTFSQENEAETRAWFTSRFLYHIGGFLLPMLVMGWCY

L2

VGVVHRLRQAQRPPQRQKAVRVAI LVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLARLKAVDNTCKLNG
 VGVVHRLRQAQRPPQRQKAVRVAI LVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLERLKAVNSSCELSG

L3

SLPVAITMCEFLGLAHCCLNPMPLYTFAGVKFRSDLSRLLTKLGCTGPASLCQLFPSWRRS
YLSVAITLCEFLGLAHCCLNPMPLYTFAGVKFRSDLSRLLTKLGAGPASLCQLFPNWRKS
 SLSEENATSLTTF
 SLSEENATSLTTF

图6

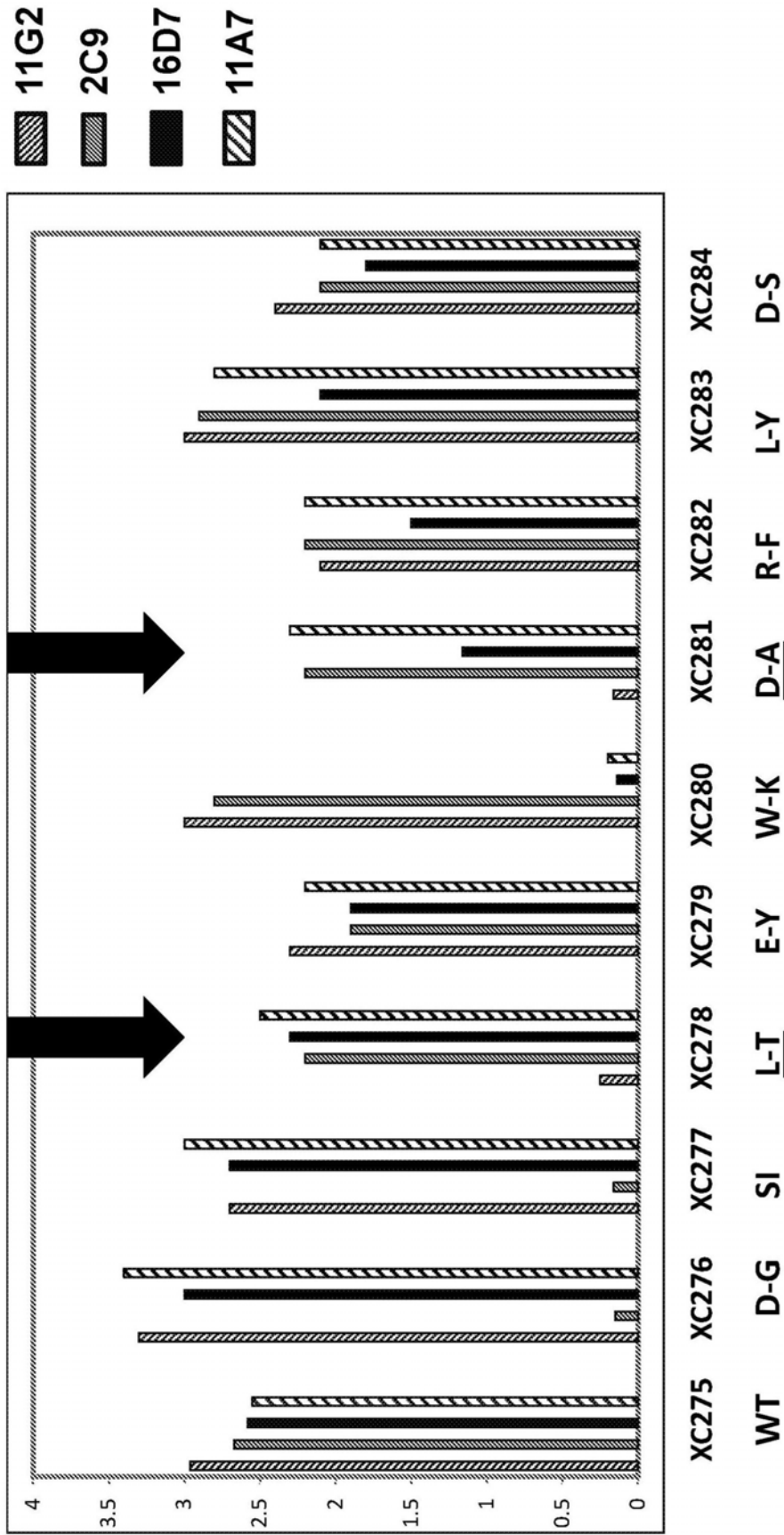


图7

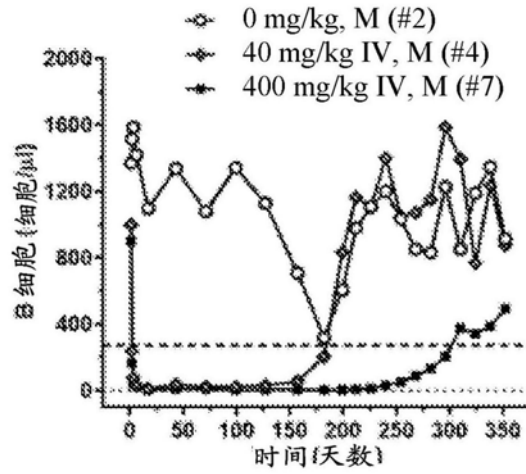


图8A

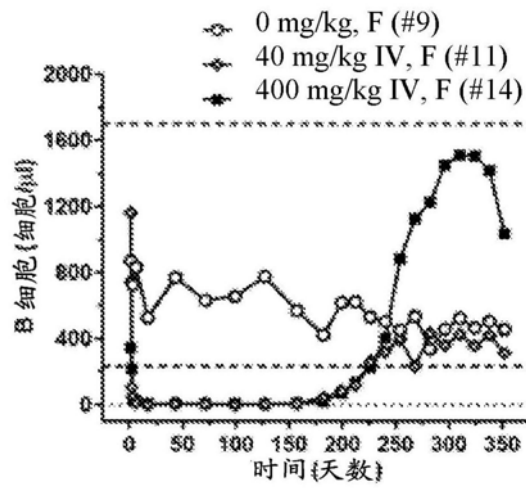


图8B

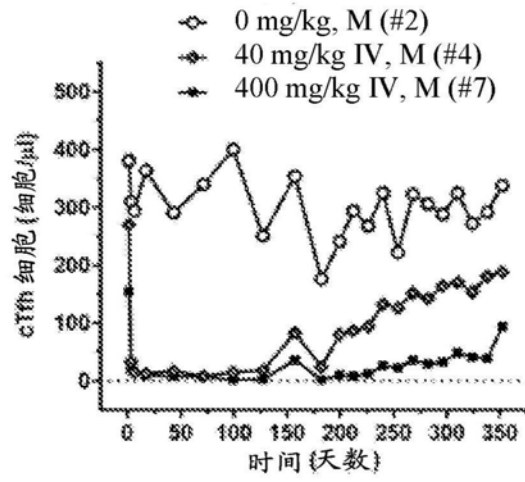


图8C

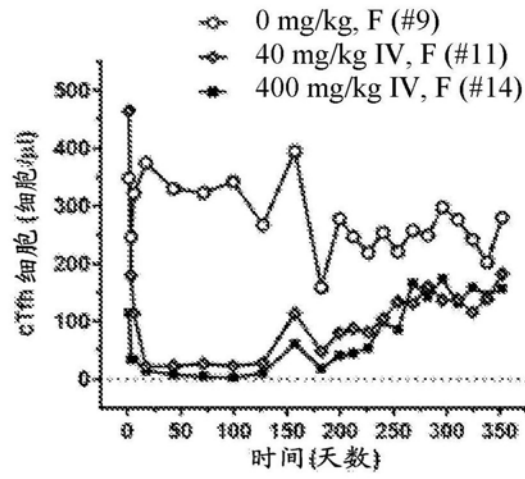


图8D

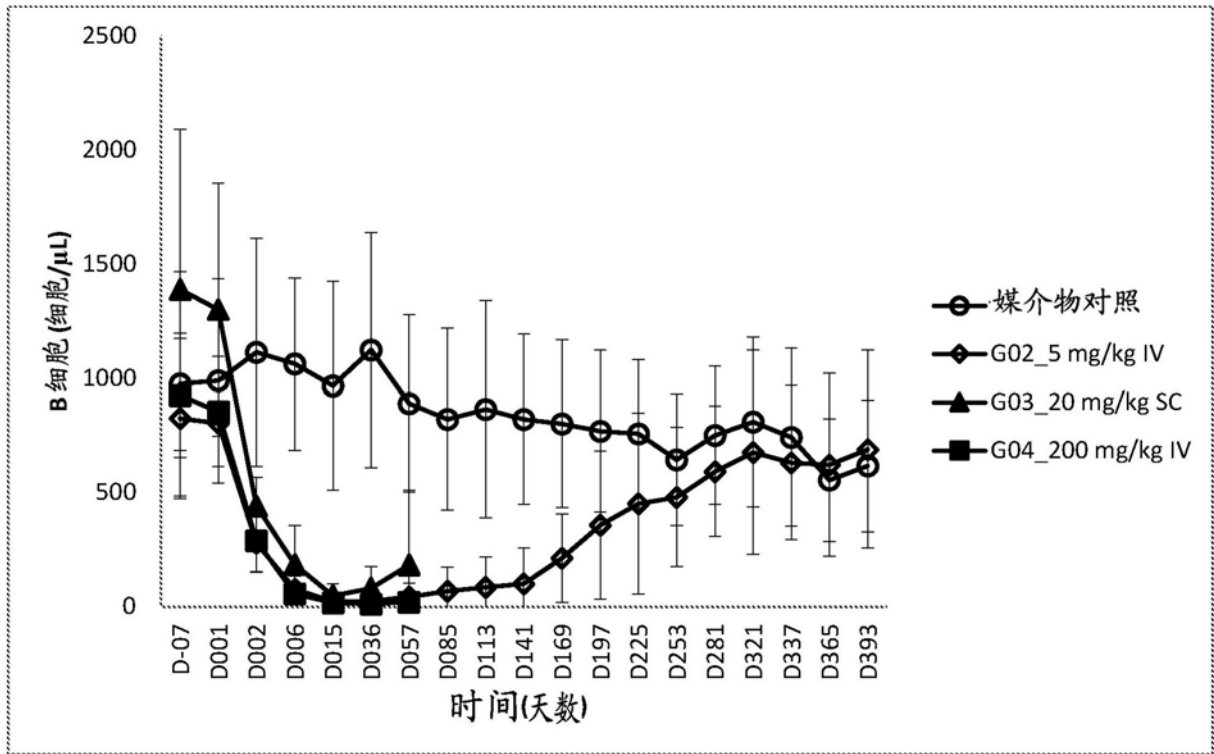


图9A

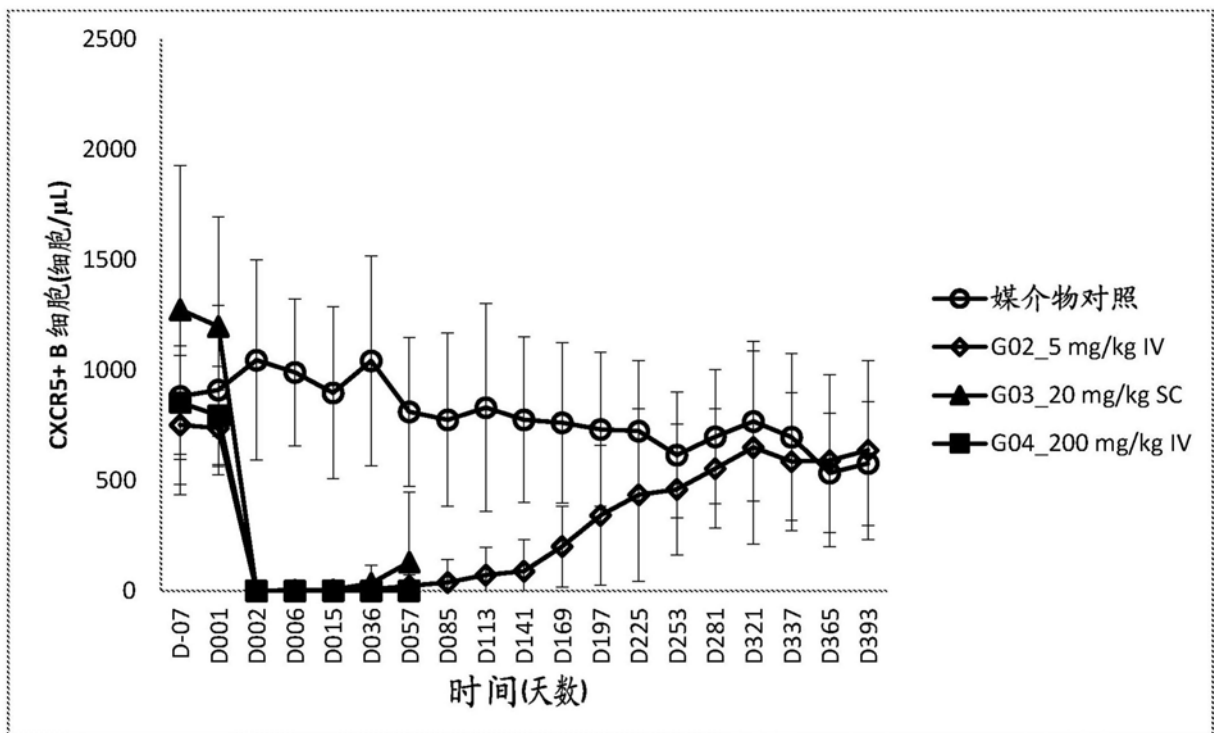


图9B

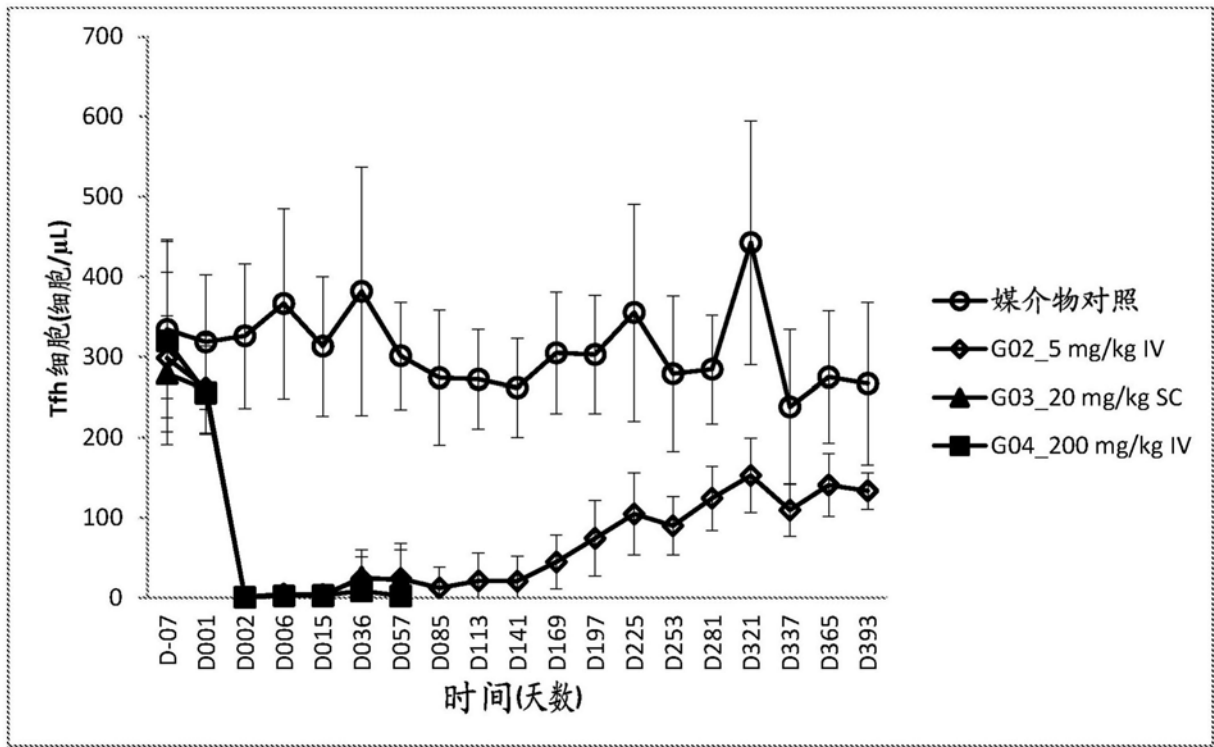


图9C

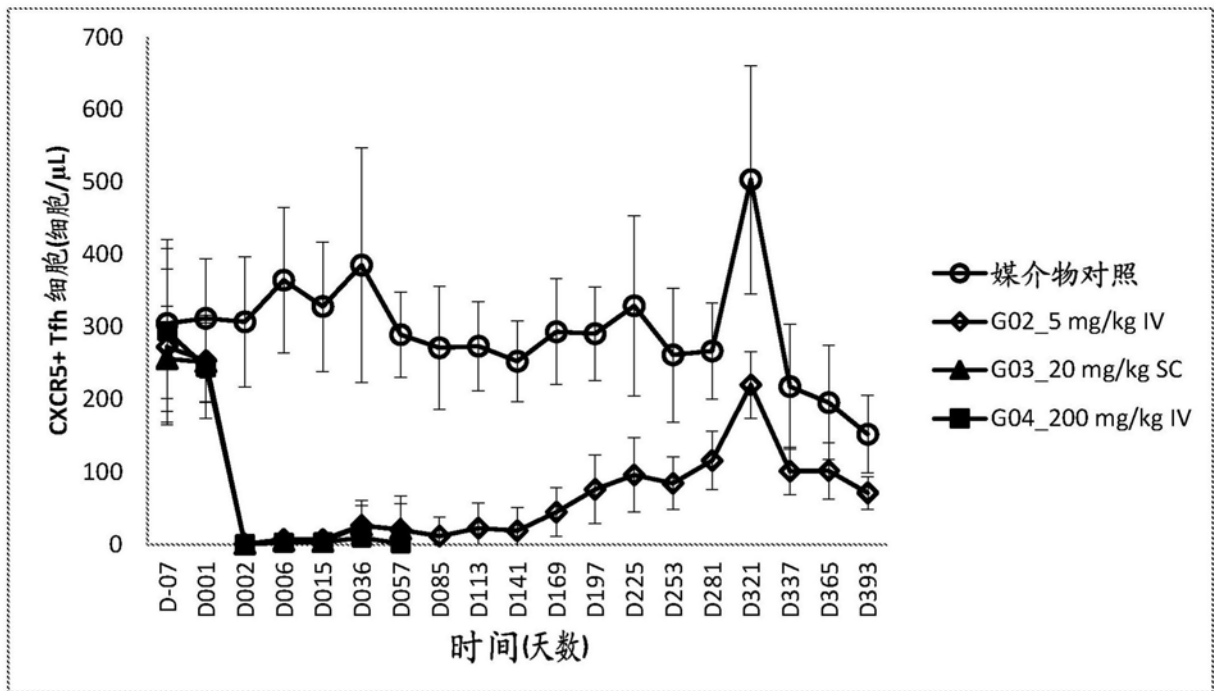


图9D