



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104520323 B

(45)授权公告日 2018.05.04

(21)申请号 201380022683.4

(22)申请日 2013.03.01

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104520323 A

(43)申请公布日 2015.04.15

(30)优先权数据

61/606,049 2012.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.10.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/028602 2013.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/130959 EN 2013.09.06

(73)专利权人 瓦西尼斯公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 E·S·史密斯 M·左德勒

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 余颖

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101636413 A, 2010.01.27,

WO 2008102123 A1, 2008.08.28,

WO 2008121940 A1, 2008.10.09,

审查员 刘新蕾

权利要求书1页 说明书32页

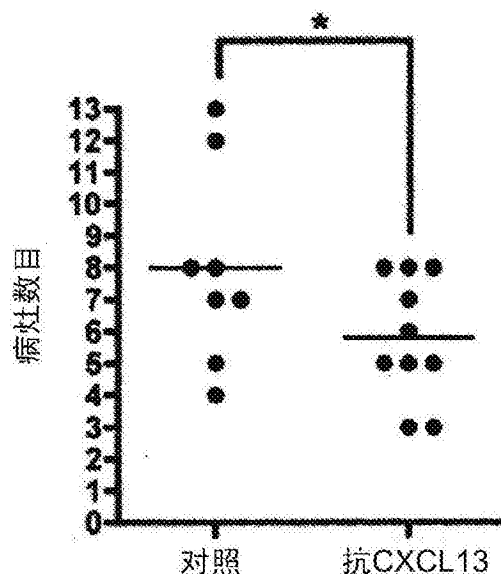
序列表14页 附图3页

(54)发明名称

用于治疗B细胞介导的炎性疾病的方法

(57)摘要

本发明提供了用于治疗CXCL13表达相关疾病的方法,包括某些自身免疫和炎性疾病(如干燥综合征)。所述方法包括给予需要治疗的对象有效量的抑制CXCL13活性的物质。根据本文所示本发明的方面,提供了一种治疗、预防对象中B细胞介导炎性病症或减轻其恶化的方法,包括给予对象有效量的分离的特异性结合CXCL13的结合分子,所述分子阻止或抑制CXCL13的活性。



1. 用特异性结合CXCL13的抗体或抗原结合片段制备治疗对象中干燥综合征的药物的用途,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域,所述重链可变结构域包含氨基酸序列为SEQ ID NO:11的重链可变区互补决定区-1(VH-CDR1),氨基酸序列为SEQ ID NO:12的重链可变区互补决定区-2(VH-CDR2),氨基酸序列为SEQ ID NO:13的重链可变区互补决定区-3(VH-CDR3);所述轻链可变结构域包含氨基酸序列为SEQ ID NO:20的轻链可变区互补决定区-1(VL-CDR1),氨基酸序列为SEQ ID NO:17的轻链可变区互补决定区-2(VL-CDR2),和氨基酸序列为SEQ ID NO:18的轻链可变区互补决定区-3(VL-CDR3)。

2. 如权利要求1所述的用途,所述抗体是嵌合或人源化的。

3. 如权利要求1所述的用途,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含序列为SEQ ID NO:14的VH结构域。

4. 如权利要求1所述的用途,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含序列为SEQ ID NO:19的VL结构域。

5. 如权利要求1所述的用途,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含序列为SEQ ID NO:14的VH结构域和序列为SEQ ID NO:19的VL结构域。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的用途,所述抗体是IgG1 κ 抗体。

7. 如权利要求6所述的用途,所述抗体在重链中包含人IgG1恒定区,在轻链中包含人 κ 区。

8. 如权利要求1-5任一所述的用途,所述抗体在重链中包含小鼠IgG2a恒定区,在轻链中包含小鼠 κ 区。

9. 如权利要求1所述的用途,所述抗原结合片段选自Fab、F(ab')₂、Fv和scFv。

10. 如权利要求1所述的用途,所述药物包含药学上可接受的运载体。

用于治疗B细胞介导的炎性疾病的方法

[0001] 关于通过EFS-WEB以文本文件形式提交的序列表

[0002] 序列表的正式文本通过EFS-Web以ASCII格式的序列表电子化提交,文件名430529SEQLIST.TXT,2013年2月28日生成,大小41,282字节,与说明书同时提交。该ASCII格式文档中所含的序列表是本说明书一部分且通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般地涉及炎性疾病的治疗,尤其是B细胞介导的炎性疾病。

[0004] 发明背景

[0005] 产生有自身抗体(针对自身抗原的抗体)生成潜能的B细胞在正常生理情况下是常见的。然而,这种天然自身抗体是低亲和性IgM抗体,其表现出广谱反应性并且对可溶性自身抗原相比细胞表面抗原具有强优先性(参见例如Dichiero等,J.Immunol.134(2):765-771(1985);Cote等,Proc.Natl.Acad.Sci 83:2959-2963(1986))。自身反应的低亲和性B细胞经历细胞凋亡,并且因此不太可能危及健康生物体。

[0006] 在一些情况下,产生自身抗体的B细胞数目的增加、其被招募至特定区域或所产生自身抗体的亲和性增加会导致自身免疫疾病的发生。某些自身免疫疾病的特征是在特定的自身抗体,所述自身抗体被认为有助于疾病发病和疾病状态的维持。

[0007] 干燥综合征(SS)是一种罕见的自身免疫疾病,影响约0.2至0.7%的总人群。通常,其出现在40至60岁,且估计具有9:1女性倾向。值得注意的是,该疾病以原发和继发形式出现。原发形式主要影响唾液腺和泪腺,而继发形式与其他自身免疫结缔组织疾病(如类风湿性关节炎(RA)和系统性红斑狼疮(SLE))共同出现。患有原发性和继发性SS(分别为pSS和sSS)的患者同时具有疾病的口部和眼部表现。虽然SS诱导的口腔干燥(口干症)和眼睛干燥(干眼病)对于患者的生活质量具有显著的消极影响,越来越多的文献显示了该疾病的其他使人虚弱的方面,包括骨骼肌、肺和肾表现,皮肤病变,白细胞破坏性脉管炎,雷诺氏现象,血液学并发症,肝脏病变和B细胞淋巴瘤。因此,该疾病的两种形式都造成了患病个体显著的发病率和死亡率。参见Voulgarelis等,Arthritis Rheum(1999) 42:1765-1772;García-Carrasco等,J Rheumatol (2002) 29:726-730;Ramos-Casals等,Medicine (Baltimore) (2002) 81:281-292;Fox,Lancet (2002) 366:321-331;Ekström等,Blood (2008) 111:4029-4038;和Delalande等,Medicine (Baltimore) (2008) 83:280-291。因此,存在对于自身免疫疾病(如干燥综合征)和其他炎性疾病的治疗疗法研发的需要。

发明内容

[0008] 本发明提供了用于治疗CXCL13表达相关疾病的方法,包括某些自身免疫和炎性疾病。根据本文所示本发明的方面,提供了一种治疗、预防对象中B细胞介导炎性病症或减轻其恶化的方法,包括给予对象有效量的能够阻止或抑制CXCL13活性的物质。在一些实施方式中,所述物质抑制CXCL13与其受体(如CXCR5或CXCR3)之间的相互作用。在某些实施方式中,所述物质是特异性结合CXCL13的分离的结合分子。在其他实施方式中,所述物质是特异

性结合CXCL13受体(如CXCR5或CXCR3)或CXCL13受体(如CXCR5或CXCR3)可溶形式的分离的结合分子。

[0009] 在本文所示某些方面,通过给予阻止或抑制CXCL13活性的物质所治疗的B细胞介导炎性病症是干燥综合征。

[0010] 本发明涵盖如下实施方式:

[0011] 1.一种治疗对象中干燥综合征的方法,所述方法包括给予需要治疗的对象有效量的抑制CXCL13活性的物质。

[0012] 2.如实施方式1所述的方法,所述物质是特异性结合CXCR5的结合分子。

[0013] 3.如实施方式1所述的方法,所述物质是特异性结合CXCR13的结合分子。

[0014] 4.如实施方式2或3所述的方法,所述结合分子包括抗体或其抗原结合片段。

[0015] 5.如实施方式4所述的方法,所述抗体是嵌合、人或人源化的。

[0016] 6.如实施方式4或5所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变结构域与SEQ ID NO:10或14中所列氨基酸序列具有至少90%序列相同性。

[0017] 7.如实施方式4或5所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含重链可变(VH)结构域,除20个或更少的保守性氨基酸取代外,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:10或14中所列序列相同的氨基酸序列。

[0018] 8.如实施方式6或7所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的VH结构域。

[0019] 9.如实施方式4-8中任一项所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变结构域与SEQ ID NO:15、19或21中所列氨基酸序列具有至少90%序列相同性。

[0020] 10.如实施方式4-8中任一项所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域,除20个或更少的保守性氨基酸取代外,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:15、19或21中所列序列相同的氨基酸序列。

[0021] 11.如实施方式9或10所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:19中所列序列的VL结构域。

[0022] 12.如实施方式4或5所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域,所述重链可变结构域和轻链可变结构域具有与选自下组的VL和VL序列具有至少90%相同性的氨基酸序列:

[0023] a) 分别是SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:19;

[0024] b) 分别是SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:21;

[0025] c) 分别是SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:15。

[0026] 13.如实施方式4或5所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域,所述重链可变结构域和轻链可变结构域各自除20个或更少的保守性氨基酸取代外,具有与选自下组的VH和VL序列相同的氨基酸序列:

[0027] a) 分别是SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:19;

[0028] b) 分别是SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:21;

- [0029] c) 分别是SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:15。
- [0030] 14. 如实施方式4或5所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含重链可变(VH) 结构域和轻链可变(VL) 结构域, 所述重链可变结构域和轻链可变结构域具有与选自下组的VH和VL序列相同的氨基酸序列:
- [0031] a) 分别是SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:19;
- [0032] b) 分别是SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:21;
- [0033] c) 分别是SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:15。
- [0034] 15. 如实施方式9所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:19中所列序列的VL结构域。
- [0035] 16. 如实施方式4或5所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含具有至少一种以下互补决定区(CDR) 的VH结构域:
- [0036] a) 与SEQ ID NO:11具有至少90%序列相同性的CDR1;
- [0037] b) 与SEQ ID NO:12具有至少90%序列相同性的CDR2; 以及
- [0038] c) 与SEQ ID NO:13具有至少90%序列相同性的CDR3。
- [0039] 17. 如实施方式4或5所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含具有至少一种以下互补决定区(CDR) 的VH结构域:
- [0040] a) 除两个或更少的氨基酸取代外, 具有与SEQ ID NO:11相同的氨基酸序列的CDR1;
- [0041] b) 除四个或更少的氨基酸取代外, 具有与SEQ ID NO:12相同的氨基酸序列的CDR2;
- [0042] c) 除四个或更少的氨基酸取代外, 具有与SEQ ID NO:13相同的氨基酸序列的CDR3;
- [0043] 18. 如实施方式16或17所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含VH结构域, 所述VH结构域包含具有SEQ ID NO:11中所列序列的CDR1、具有SEQ ID NO:12中所列序列的CDR2和具有SEQ ID NO:13中所列序列的CDR3。
- [0044] 19. 如实施方式4、5或16-18中任一项所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含具有至少一种以下互补决定区(CDR) 的VL结构域:
- [0045] a) 与SEQ ID NO:17或20具有至少90%序列相同性的CDR1;
- [0046] b) 与SEQ ID NO:17具有至少90%序列相同性的CDR2; 以及
- [0047] c) 与SEQ ID NO:18具有至少90%序列相同性的CDR3。
- [0048] 20. 如实施方式4、5或16-18中任一项所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段包含具有至少一种以下互补决定区(CDR) 的VL结构域:
- [0049] a) 除四个或更少的氨基酸取代外, 具有与SEQ ID NO:17或20相同的氨基酸序列的CDR1;
- [0050] b) 除两个或更少的氨基酸取代外, 具有与SEQ ID NO:17相同的氨基酸序列的CDR2; 以及
- [0051] c) 除两个或更少的氨基酸取代外, 具有与SEQ ID NO:18相同的氨基酸序列的CDR3。
- [0052] 21. 如实施方式19或20所述的方法, 特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片

段包含VL结构域,所述VL结构域包含具有SEQ ID NO:20中所列序列的CDR1、具有SEQ ID NO:17中所列序列的CDR2和具有SEQ ID NO:18中所列序列的CDR3。

[0053] 22.如实施方式4-21中任一项所述的方法,所述抗体是IgG1 κ 抗体。

[0054] 23.如实施方式22所述的方法,所述抗体包含VH结构域中的人IgG1恒定区和VL结构域的所述恒定区中的人 κ 区。

[0055] 24.如实施方式4所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或抗原结合片段选自下组:

[0056] a) 单克隆抗体5261;

[0057] b) 单克隆抗体5378;

[0058] c) 单克隆抗体5080;

[0059] d) 单克隆抗体1476;

[0060] e) 单克隆抗体3D2;

[0061] f) a) -e) 中任一单克隆抗体的嵌合或人源化形式;

[0062] g) 与选自a) -e) 的参考单克隆抗体结合相同CXCL13表位的抗体或抗原结合片段;

[0063] h) 竞争性抑制选自a) -e) 的参考单克隆抗体的抗体或抗原结合片段;以及

[0064] i) a) -h) 中任一个的抗原结合片段。

[0065] 25.如实施方式24所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体选自所述单克隆抗体5261、所述单克隆抗体5378、所述单克隆抗体5080、所述单克隆抗体1476和所述单克隆抗体3D2。

[0066] 26.如实施方式25所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体是所述单克隆抗体5378。

[0067] 27.如实施方式4-24中任一项所述的方法,所述抗原结合片段选自Fab、F(ab')₂、Fv和scFv。

[0068] 28.如实施方式1所述的方法,所述物质是可溶形式的CXCR5或CXCR3。

[0069] 29.如实施方式1-28中任一项所述的方法,所述物质抑制CXCL13与CXCL13受体的相互作用。

[0070] 30.如实施方式29所述的方法,所述CXCL13受体是CXCR5或CXCR3。

[0071] 31.如实施方式1-30中任一项所述的方法,所述方法预防所述对象中的干燥综合征。

[0072] 32.如实施方式1-31中任一项所述的方法,所述物质与药学上可接受的运载体一起给予。

[0073] 33.一种治疗对象中干燥综合征的方法,包括给予需要治疗的对象有效量的特异性结合CXCL13的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段抑制CXCL13的活性。

[0074] 34.如实施方式33所述的方法,特异性结合CXCL13的所述抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:19中所列序列的轻链可变结构域。

[0075] 35.如实施方式33所述的方法,所述抗体或其抗原结合片段抑制CXCL13与CXCR5的相互作用。

[0076] 36.如实施方式1-35中任一项所述的方法,所述对象是动物。

[0077] 37.如实施方式36所述的方法,所述动物是哺乳动物。

[0078] 38.如实施方式37所述的方法,所述哺乳动物是人。

[0079] 下文发明的说明书中更详细地公开了本发明的这些和其他方面。

[0080] 附图简要说明

[0081] 图1A显示了来自雌性NOD/ShiLtJ (NOD) 小鼠的苏木精和伊红 (H&E) 染色的唾液腺样品,所述小鼠用同种型对照抗体(左图)或抗CXCL13抗体(右图)治疗,从4周龄开始每周治疗3次共持续12周。在16周龄时处死后移出唾液组织用于分析。图1B显示了同种型对照和抗CXCL13抗体治疗的样品的颌下组织中淋巴细胞病灶的数目。

[0082] 图2显示了上述同种型对照抗体或抗CXCL13抗体治疗后小鼠唾液组织中CXCR5 mRNA的表达。

[0083] 图3显示了上述同种型对照抗体或抗CXCL13抗体治疗后小鼠唾液组织中CD19 mRNA的表达。

[0084] 图4显示了上述同种型对照抗体或抗CXCL13抗体治疗后小鼠唾液组织中CD4 mRNA的表达。

[0085] 发明详述

[0086] 内稳态B细胞趋化因子1 (BCA-1) 也称为CXCL13 (或ANGIE、BLC、BLR1L、ANGIE2或Scyb13),在次级淋巴器官(如脾、淋巴结和派尔斑)中由滤泡型树突细胞(FDC)和巨噬细胞组成型表达。参见Gunn等,Nature 391:799-803(1998)和Carlsen等,Blood 104(10):3021-3027(2004)。CXCL13主要通过G蛋白偶联CXCR5受体(伯基特淋巴瘤受体1)作用。例如在成熟的B淋巴细胞、CD4+滤泡型辅助T细胞(Thf细胞)、小部分CD8+T细胞和活化的扁桃体调节性T细胞(Treg)上表达CXCR5。参见Legler等,J.Exp.Med.187:655-660(1998); Förster等,Blood 84:830-840(1994);Fazilleau等,Immunity 30:324-335(2009);Ansel等,J.Exp.Med.190:1123-1134(1999);Lim等,J.Clin.Invest.114(11):1640-1649(2004);和R. Förster,Chapter in Academic Press Cytokine Reference,2000年8月;上述各文献都通过引用全文纳入本文。CXCL13也可通过另一个趋化因子受体CXCR3传递信号,其由例如中等至大血管的活化T细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突细胞和内皮细胞表达(Jenh等,Cytokine 15:113-121(2001);García-López等,Laboratory Investigation 81:409-418(2001),上述各文献都通过引用全文纳入本文。)

[0087] 本文所用的术语“CXCL13”和“CXCL13多肽”可互换使用。在某些实施方式中,CXCL13可包括全长CXCL13或其片段,或者CXCL13变体多肽,其中CXCL13的片段或CXCL13变体多肽保持全长CXCL13的一些或全部功能特性。人CXCL13多肽和多核苷酸序列(分别为SEQ ID NO:1和2)已有描述,参见例如Legler等,J.Exp.Med.187(4):655-660(1998)。小鼠CXCL13多肽和多核苷酸序列(分别为SEQ ID NO:3和4)已有描述,参见例如Gunn等,Nature391(6669):799-803(1998)。另外,描述了短尾猴CXCL13多肽序列,如SEQ ID NO:5所示。

[0088] 本文所用的术语“CXCR5”和“CXCR5多肽”可互换使用。在某些实施方式中,CXCR5可包括全长CXCR5或其片段,或者CXCR5变体多肽,其中CXCR5的片段或CXCR5变体多肽保持全长CXCR5的一些或全部功能特性。术语“CXCR5”和“CXCR5多肽”还包括可溶形式CXCR5。本文所用术语“可溶形式CXCR5”是不结合质膜的CXCR5形式。全长CXCR5是7次跨膜受体。因此,可

溶形式CXCR5的非限制性示例包括基本由胞外结构域组成的CXCR5片段(例如约开始的60个氨基酸)。人CXCR5多核苷酸和多肽序列是本领域已知的且在本文中分别作为SEQ ID NO:6和7提供。鼠CXCR5多核苷酸和多肽序列是本领域已知的且在本文中分别作为SEQ ID NO:8和9提供。

[0089] 本文所用的术语“CXCR3”和“CXCR3多肽”可互换使用。在某些实施方式中,CXCR3可包括全长CXCR3或其片段,或者CXCR3变体多肽,其中CXCR3的片段或CXCR3变体多肽保持全长CXCR3的一些或全部功能特性。术语“CXCR3”和“CXCR3多肽”还包括可溶形式CXCR3。本文所用术语“可溶形式CXCR3”是不结合质膜的CXCR3形式。全长CXCR3是7次跨膜受体。因此,可溶形式CXCR3的非限制性示例包括基本由胞外结构域组成的CXCR3片段。人CXCR3多核苷酸和多肽序列是本领域已知的且在本文中分别作为SEQ ID NO:22和23提供,分别是人CXCR3变体1和变体3。

[0090] 如本文所示,CXCL13活性的抑制减少了干燥综合征鼠模型中的唾液腺炎症并导致唾液腺中存在的B细胞数目减少。虽然不受任何理论或作用机理的限制,但认为CXCL13涉及干燥综合征中B细胞至唾液组织的迁移。因此,提供了通过给予需要治疗的对象抑制CXCL13活性的物质以治疗炎性疾病(尤其是B细胞介导的炎性疾病,包括但不限于干燥综合征)的方法。

[0091] 本发明公开的方法涉及与表达CXCL13的细胞相关的炎性疾病和免疫系统缺陷或紊乱的治疗或预防。“表达CXCL13的细胞”指表达CXCL13抗原的正常和恶性细胞。本领域熟知检测细胞内CXCL13表达的方法,包括但不限于:PCR技术、免疫组化、流式细胞术、Western印迹、ELISA等。

[0092] 炎性疾病的特征是炎症和组织破坏,或其组合。“抗炎活性”指减轻或预防炎症。“炎性疾病”包括任何炎症免疫介导的过程,其中免疫应答的启动事件或靶标包括非自身抗原,包括例如,同种抗原、异种抗原、病毒抗原、细菌抗原、未知抗原或变应原。

[0093] 在一个实施方式中,所述炎性疾病是外周或中枢神经系统的炎性疾病。

[0094] 在一些实施方式中,所述炎性疾病是B细胞介导的炎性疾病。本文所用术语“B细胞介导的炎性疾病”是本文所述的炎性疾病,其中疾病的发病、发展或发病和发展都主要依赖B细胞的活性。B细胞介导的炎性疾病的非限制性示例包括以产生自身抗体为特征的那些疾病。

[0095] “B细胞”是在骨髓中成熟的淋巴细胞,且包括初始B细胞、记忆B细胞或效应B细胞(浆细胞)。本文中的B细胞可以是正常或非恶性B细胞。

[0096] 本文中“B细胞表面标记”或“B细胞表面抗原”是在可使用与之结合的拮抗剂靶向的B细胞表面表达的抗原。示例性B细胞表面标记包括,例如,CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85和CD86,和CXCR5。与哺乳动物的其他非B细胞组织相比,特别感兴趣的B细胞表面标记优选在B细胞上表达且可在前体B细胞和成熟B细胞上表达。本文中优选的B细胞表面标记是CD19和CXCR5。出于本发明的目的,术语“炎性疾病”包括但不限于“自身免疫疾病”。本文所用的术语“自身免疫疾病”通常理解为包括涉及“自身”抗原的炎症免疫介导的过程。在自身免疫疾病中,自身抗原引发宿主免疫应答。

[0097] 在一个实施方式中,使用本发明的抗CXCL13结合分子(如抗体或抗原结合片段)治

疗或预防干燥综合征。

[0098] 本文中“干燥综合征”也称为西卡综合征(Sicca syndrome),是一种自身免疫疾病或紊乱,其中免疫细胞攻击产生泪和唾液的腺体。该疾病的标志性症状是口腔干燥和眼睛干燥。此外,干燥综合征可导致皮肤、鼻和阴道干燥,并可影响身体的其他器官,包括肾、血管、肺、肝、胰腺和大脑。干燥综合征可以原发性疾病(“原发性干燥综合征”)或继发性疾病(“继发性干燥综合征”)的形式存在,所述继发性疾病与其他自身免疫疾病相关和/或是其他自身免疫疾病继发的,所述其他自身免疫疾病包括类风湿性疾病(如类风湿性关节炎、系统性红斑、多肌炎、硬皮病和自身免疫肝炎)、淋巴瘤(如非霍奇金淋巴瘤)和内分泌紊乱(如甲状腺炎)。本文所用术语“干燥综合征”使用时不论干燥综合征处于何种阶段(包括原发和继发干燥综合征)和干燥综合征表现出何种症状,前提是做出了诊断。用于该综合征的诊断包括下文所列的那些。它还包括具有中度-严重西卡症状且不具有全身表现的患者,以及具有全身症状的患者。

[0099] 在某些实施方式中,给予需要治疗的对象物质以治疗以异位淋巴滤泡或生发中心存在或者招募B细胞至受影响组织为特征的炎性疾病。在一些这类实施方式中,抑制CXCL13活性的物质抑制异位淋巴滤泡或生发中心的形成。

[0100] 在一个实施方式中,治疗包括将抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)应用于或给予患者,或将所述物质应用于或给予从患者处分离的组织或细胞系,其中所述患者有疾病、疾病症状或疾病倾向。在另一实施方式中,治疗还意在包括将包含抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的药物组合物应用于或给予患者,或将包含所述物质的药物组合物应用于或给予从患者处分离的组织或细胞系,其中所述患者有疾病、疾病症状或疾病倾向。

[0101] 按照本发明的方法,使用至少一种抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)以促进对自身免疫病症和/或炎性疾病的治疗或预防的积极治疗响应。对于自身免疫病症和/或炎性疾病,“积极治疗响应”指与这些给予的物质的抗炎活性、抗血管新生活性、抗凋亡活性等相关的疾病改善,和/或疾病相关症状的改善。也就是说,可观察到抗增殖作用、防止表达CXCL13细胞的进一步增殖、减轻炎症反应(包括但不限于炎性细胞因子、粘着分子、蛋白酶、免疫球蛋白(在携带CXCL13的细胞是B细胞的情况下)、其组合等的分泌减少)、抗炎蛋白产量增加、自身反应性细胞数量减少、免疫耐受提高、自身反应性细胞存活被抑制、凋亡减少、内皮细胞迁移减少、自发性单核细胞迁移增加、异位淋巴滤泡数目的减少、受影响组织中存在的B细胞数目的减少、B细胞至受感染组织迁移的减少、通过刺激CXCL13表达细胞介导的一种或多种症状减轻和/或降低。这种积极治疗响应不仅限于给药途径,可包括给体、供体组织(如器官灌注)、宿主、其任何组合等。可利用筛选技术评估临床响应,如磁共振成像(MRI)扫描、x-射线成像、计算机断层成像(CT)扫描、流式细胞术或荧光活化细胞分选仪(FACS)分析、组织学分析、大体病理学分析和血液化学分析,包括但不限于可通过ELISA、RIA、色谱等检测到的改变。除这些积极治疗响应外,接受抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)治疗的对象可产生疾病相关症状改善的有益效果。

[0102] 本文所用术语“治疗”或“处理”都指治疗性处理和预防性或预防方法,其目的是防止或减缓(缓解)、减少不期望的生理改变或病症(如干燥综合征的发展)的恶化或者预防其

复发。有益或所需的临床结果包括但不限于可检测或不可检测地：缓解症状、减轻疾病程度、疾病状态稳定（即不恶化）、延迟或减缓疾病进展、改善或减轻疾病状态和缓解（部分或完全）。“治疗”也可以指与不接受治疗的期望存活相比延长生存期。需要治疗的人包括已经患有病症或疾病的人，以及倾向于患有病症或疾病的人或需预防病症或疾病的人。

[0103] “对象”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”指需要诊断、预防或治疗的任何对象，特别是哺乳动物对象。哺乳动物对象包括人、家养动物、家畜和动物园动物、竞技动物或宠物，如犬、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、奶牛等等。

[0104] 本文中所用短语（如“因给予抑制CXCL13活性的物质而受益的对象”和“需要治疗的动物”）包括因给予抑制CXCL13活性的物质（如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体）进行治疗而受益（即疾病得到缓解或预防）的对象（如哺乳动物对象）。如本文更详细所述，抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体可以非偶联形式使用，或者可偶联于例如药物、前药或同位素。

[0105] 用于抑制CXCL13活性的物质包括小分子、多肽和多核苷酸。在某些实施方式中，所述物质阻断CXCL13与其受体的结合。在一些实施方式中，所述物质阻断CXCL13与CXCR5之间的相互作用。在其他实施方式中，所述物质阻断CXCL13与CXCR3之间的相互作用。在特定实施方式中，所述物质是特异性结合CXCL13、CXCR5或CXCR3的特异性结合分子。在一些这类实施方式中，所述物质是抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体。在其他实施方式中，所述物质是可溶形式CXCR5或CXCR3。

[0106] 本文所用的术语“多肽”意在包括单数形式“多肽”和复数形式“多肽”，指由酰胺键（也称肽键）线性连接的单体（氨基酸）所组成的分子。术语“多肽”指两个或多个氨基酸的任何一条链或多条链，而非具体长度的产物。因此，肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或其它任何用于指两个或多个氨基酸的一条或多条链的术语均包含于“多肽”的定义内，术语“多肽”可与任意这些术语替代或互换使用。术语“多肽”还指多肽表达后修饰的产物，所述修饰包括但不限于糖基化、乙酰基化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团衍生化、蛋白酶切割或非天然产生氨基酸修饰。多肽可能由天然生物来源衍生或由重组技术产生，但不必定由指定核酸序列翻译而来。可以任何方式产生多肽，包括化学合成。

[0107] 本文公开的方法中所用多肽的大小可以是约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个或者2,000个或更多个氨基酸。多肽可具有确定的三维结构，但它们不必定具有这种结构。具有确定三维结构的多肽称为折叠多肽，不具有确定三维结构、但可采用大量不同构象的多肽称为非折叠多肽。本文所用术语“糖蛋白”指偶联于至少一个糖部分的蛋白质，所述糖部分通过某些氨基酸残基，如丝氨酸残基或天冬酰胺残基的含氧或含氮侧链连接于蛋白质。

[0108] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物指不在其天然环境中的多肽。不要求特定的纯化水平。例如，可从其自然或天然环境中移出分离多肽。就本发明目的而言，在宿主细胞中表达的重组产生多肽和蛋白质被认为是分离的，通过任何合适技术分离、分级、或者部分或基本上纯化的天然或重组多肽也如此。

[0109] 本文公开的方法中所用多肽还包括多肽的片段、衍生物、类似物、变体及其任意组合。提到抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或抗体多肽时，术语“片段”、“变体”、“衍生物”和

“类似物”包括保持相应抗体或抗体多肽的至少一部分抗原结合特性的任何多肽。除本文他处讨论的具体抗体片段外，本发明多肽的片段还包括蛋白酶水解片段以及缺失片段。抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的变体包括上述片段，以及具有因氨基酸取代、缺失或插入而改变氨基酸序列的多肽。变体可以是天然产生或非天然产生的。可使用本领域已知的诱变技术生成非天然产生变体。变体多肽可包含保守或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。多肽变体在本文中也称作“多肽类似物”。本文所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或抗体多肽的“衍生物”指具有官能性侧链基团反应化学所衍生的一个或多个残基的对象多肽。“衍生物”还包括那些含有一个或多个20种标准氨基酸的天然产生氨基酸衍生物的肽。例如，4-羟基脯氨酸可取代脯氨酸；5-羟基赖氨酸可取代赖氨酸；3-甲基组氨酸可取代组氨酸；高丝氨酸可取代丝氨酸；且鸟氨酸可取代赖氨酸。抗CXCL13、抗CXCR5和抗CXCR3抗体和抗体多肽的衍生物可包括经过改变以表现出参考抗体或抗体多肽上未发现的其他特性的多肽。

[0110] 对于多肽而言，“线性序列”或“序列”是多肽中从氨基到羧基末端方向上氨基酸的顺序，在序列中彼此相邻的残基是多肽一级结构中的毗连残基。

[0111] 术语“多核苷酸”包括单个核酸和多个核酸，指分离的核酸分子或构建物，例如信使RNA (mRNA) 或质粒DNA (pDNA)。多核苷酸可包含常规磷酸二酯键或非常规键(如酰胺键，如肽核酸(PNA)中的酰胺键)。术语“核酸”指多核苷酸中存在的任何一种或多种核酸区段，如DNA或RNA片段。“分离的”核酸或多核苷酸指从其天然环境中移出的核酸分子，DNA或RNA。例如，就本发明目的而言，包含在载体中的编码抗CXCL13、抗CXCR5和抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段)的重组多核苷酸被认为是分离的。经分离多核苷酸的其它例子包括保持于异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中的纯化(部分或基本上纯化的)多核苷酸。经分离的RNA分子包括本发明中多核苷酸的体内或体外RNA转录物。本发明中分离的多核苷酸或核酸还包括合成产生的此类分子。此外，多核苷酸或核酸可以是或可包括调控元件，如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0112] 本文所用的术语“编码区”是由翻译成氨基酸的密码子组成的核酸部分。虽然“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)不翻译成氨基酸，但它可被认为是编码区的一部分，而任何侧接序列如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等均不是编码区的一部分。本文公开的方法中所用两个或多个编码区可安置在同一多核苷酸构建物中，例如在同一载体上，或者在分开的多核苷酸构建物中，例如在分开(不同)的载体上。而且，任何载体可包含单个编码区，或者可包含两个或多个编码区，例如，单一载体可单独编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。此外，本文公开的方法中所用的载体、多核苷酸或核酸可编码与抗CXCL13、抗CXCR5和抗CXCR3抗体或其片段、变体或衍生物的编码核酸融合或不融合的异源编码区。异源编码区包括但不限于专用的元件或基序，如分泌信号肽或异源功能结构域。

[0113] 在某些实施方式中，本文公开的方法中所用的多核苷酸和核酸是DNA。对DNA而言，包含多肽编码核酸的多核苷酸通常包含启动子和/或其它转录或翻译控制元件，这些元件与一个或多个编码区可操作连接。可操作地连接指，当基因产物如多肽的编码区与一个或多个调控序列以此方式连接时，该基因产物的表达将受到该调控序列的影响或控制。如果启动子功能的诱导使编码所需基因产物的mRNA转录，且如果两个DNA片段间连接的属性不干扰表达调控序列指导基因产物表达或不干扰转录DNA模板的能力，则两个DNA片段(如多

肽编码区及其相连的启动子)“可操作连接”。因此,如果启动子能够影响核酸的转录,则启动子区域与多肽编码核酸可操作连接。启动子可以是仅在预定细胞中指导DNA实质转录的细胞特异性启动子。启动子以外的其它转录控制元件如增强子、操纵子、阻遏物和转录终止信号,能与多核苷酸可操作连接以指导细胞特异性转录。本文公开了合适的启动子和其它转录控制区。

[0114] 许多转录控制区是本领域技术人员已知的。它们包括但不限于在脊椎动物细胞中发挥作用的转录控制区,例如但不限于,来自巨细胞病毒(立即早期启动子,与内含子-A联用)、猿病毒40(早期启动子)和逆转录病毒(如劳氏肉瘤病毒)的启动子和增强子区段。其它转录控制区包括衍生自脊椎动物基因,例如肌动蛋白、热激蛋白、牛生长激素和兔 β -珠蛋白的那些,以及能够在真核细胞中控制基因表达的其它序列。其它合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子,以及淋巴因子诱导型启动子(如干扰素或白介素诱导的启动子)。

[0115] 类似地,本领域普通技术人员了解各种翻译控制元件。它们包括但不限于:核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子以及衍生自小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点或IRES,也称为CITE序列)。

[0116] 在其它实施方式中,本文公开的方法中所用多核苷酸是RNA,例如,采用信使RNA(mRNA)形式。

[0117] 本文公开的方法中所用的多核苷酸和核酸编码区可与编码分泌或信号肽的其它编码区联合,所述分泌或信号肽指导本发明多核苷酸编码的多肽分泌。根据信号假说,哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦生长的蛋白质链向粗面内质网外的输出过程启动,所述序列从成熟蛋白质上切除。本领域普通技术人员了解,脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有融合于所述多肽N末端的信号肽,它们从完整或“全长”多肽上切割产生分泌或“成熟”形式的多肽。在某些实施方式中,使用天然信号肽,例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或者使用仍然能够指导与其可操作连接的多肽分泌的该序列的功能衍生物。或者,可采用异源哺乳动物信号肽或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可以用人组织纤溶酶原激活物(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸糖苷酶的前导序列代替。

[0118] 本文所用的术语“表达”指基因生成生化物质如多肽的过程。该过程包括在细胞内基因功能存在的任何表现,包括但不限于,基因敲除以及瞬时表达和稳定表达。它包括但不限于,基因转录成信使RNA(mRNA)和这类mRNA翻译成多肽。若最终期望产物是生化物质,则表达包括产生该生化物质和任何前体。基因表达产生“基因产物”。本文所用的基因产物可以是核酸,如基因转录产生的信使RNA,或由转录物翻译得到的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录后修饰的核酸,例如聚腺苷酸化,或具有翻译后修饰的多肽,如甲基化、糖基化、加入脂质、连接其它蛋白质亚基、经蛋白酶水解切割等。

[0119] “结合分子”或“抗原结合分子”以其最宽泛的含义使用,指特异性结合抗原决定簇的分子。在一个实施方式中,所述结合分子特异性结合CXCL13(也称为BCA-1)。在另一个实施方式中,所述结合分子特异性结合CXCR5。在另一个实施方式中,所述结合分子特异性结合CXCR3。而在另一实施方式中,本文公开的方法中所用的结合分子是抗体或其抗原结合片段,如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体。在另一个实施方式中,结合分子包括抗体分子的至少一个重链或轻链CDR。在另一个实施方式中,结合分子包括来自一种或多种抗体分子的

至少两个CDR。在另一个实施方式中,结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少三个CDR。在另一个实施方式中,结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少四个CDR。在另一个实施方式中,结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少五个CDR。在另一个实施方式中,结合分子包括来自一种或多种抗体分子的至少六个CDR。在某些实施方式中,一个或多个CDR来自MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476或3D2。

[0120] 在一些实施方式中,本发明公开的方法涉及某些抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物。除非特别提到完整大小的抗体如天然产生的抗体,术语“抗CXCL13抗体”、“抗CXCR5抗体”和“抗CXCR3抗体”包括完整大小的抗体以及这种抗体的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,例如天然产生的抗体或免疫球蛋白分子,或以类似于抗体分子的方式结合抗原的经工程改造的抗体分子或片段。

[0121] 本文所用的“人”或“完全人”抗体包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体,包括分离自人免疫球蛋白文库或不表达内源性免疫球蛋白的一种或多种人免疫球蛋白转基因动物的抗体,如下文所述,例如,Kucherlapati等的美国专利号5,939,598。“人”或“完全人”抗体也包括至少含重链可变区或至少重链和轻链可变区的抗体,其中所述可变区具有人免疫球蛋白可变区的氨基酸序列。

[0122] “人”或“完全人”抗体还包括上文所述包含已知的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体分子(如VH区和/或VL区)的变体(包括衍生物)或基本由其组成或由其组成的“人”或“完全人”抗体,所述抗体或其片段免疫特异性结合于CXCL13、CXCR5或CXCR3多肽或其片段或变体。可利用本领域技术人员已知的标准技术在编码人抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的核苷酸序列中引入突变,包括但不限于,引起氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。优选地,相对于参考VH区、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VL区、VLCDR1、VLCDR2或VLCDR3,该变体(包括衍生物)编码少于50个氨基酸取代、少于40个氨基酸取代、少于30个氨基酸取代、少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。

[0123] 在某些实施方式中,氨基酸取代是保守性氨基酸取代,如下所详述。或者,也可沿所有或部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和诱变引入,可筛选所得突变体的生物学活性以鉴定保持活性(例如,结合CXCL13、CXCR5或CXCR3多肽,例如人、鼠或人和鼠CXCL13、CXCR5或CXCR3的能力)的突变体。“人”或“完全人”抗体的这类变体(或其衍生物)也可称为“优化”或“就抗原结合优化”的人或完全人抗体,包括对抗原亲和性提高的抗体。

[0124] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。抗体或免疫球蛋白至少包括重链可变区,通常至少包括重链和轻链的可变区。较好地理解了脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构。参见例如,Harlow等(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》)(第2版;冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press))。

[0125] 正如下文中更详细讨论,术语“免疫球蛋白”包括可通过生化性质区分的各种类型多肽。本领域技术人员应理解,重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其中还有一些小类(如 $\gamma 1-\gamma 4$)。该链的特性决定抗体“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白小类(同种型)如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等已被良好表征,且已知产生功能特化。根据本文公开内容,本领域技术人员不难区分这些类别和同种型的修饰形式,因此,它们涵盖在本发明范围内。所有免疫球蛋白类别明显属于本发明范围,以下讨论通常针对免疫球蛋白分子的IgG类。在

IgG中,标准的免疫球蛋白分子包括分子量约为23,000道尔顿的两条相同轻链多肽和分子量为53,000-70,000的两条相同重链多肽。这四条链通常在“Y”构型中由二硫键连接起来,其中轻链从Y的口部开始托起重链,并延续通过可变区。

[0126] 轻链分类为 κ 或 λ 。各重链类可与 κ 或 λ 轻链结合。通常,通过杂交瘤、B细胞或遗传工程改造的宿主细胞产生免疫球蛋白时,轻链和重链互相共价结合,两条重链的“尾部”通过共价二硫键或非共价连接互相结合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的分叉末端的N末端走向每条链底部的C末端。

[0127] 轻链和重链都可以分成结构和功能同源的区域。从功能角度使用术语“恒定”和“可变”。在这方面,应理解轻链(VL或VK)和重链(VH)部分的可变区决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定区产生重要的生物学特性,例如分泌、跨胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。通常,恒定区结构域的编号越大,离抗体的抗原结合位点或氨基末端越远。N-末端部分是可变区,C-末端部分是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包括重链和轻链的羧基末端。

[0128] 如本文所述,可变区允许抗体选择性识别并特异性结合抗原上的表位。也就是说,抗体的VL和VH结构域、或这些可变区内的互补决定区(CDR)亚组组合形成确定三维抗原结合位点的可变区。这种四联抗体结构形成在Y的每条臂末端存在的抗原结合位点。更具体地,所述抗原结合位点由各VH和VL链上的三个CDR确定。在一些情况下,例如在衍生自羊驼种类或根据羊驼免疫球蛋白工程改造的某些免疫球蛋白分子中,完整的免疫球蛋白分子可仅由重链构成而不含轻链。参见例如Hamers-Casterman等,Nature 363:446-448 (1993)。

[0129] 在天然产生的抗体中,每个抗原结合结构域上出现的六个“互补决定区”或“CDR”是短的非毗连氨基酸序列,随着抗体在水性环境中确定其三维构型时,它们特别定位以形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸称为“构架”区,显示较小的分子间差异。构架区主要采用 β -片层构象,CDR形成连接 β -片层结构和某些情况下形成部分 β -片层结构的环。因此,构架区用于通过链间非共价相互作用形成为CDR提供正确方向位置的支架。定位的CDR形成的抗原结合结构域确定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这种互补表面促进抗体与其关联表位的非共价结合。对于任何给定的重链或轻链可变区,本领域普通技术人员能容易地鉴定分别包含CDR和构架区的氨基酸,因为它们已被精确定义(见下文)。

[0130] 除非明确表述为相反的含义,否则在本领域内所使用和/或接受的某一术语有两种或多种定义的情况下,本文所用的术语定义应包括所有这些含义。具体示例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非毗连抗原结合位点。这一特定区域的描述可参见Kabat等(1983)美国健康和公共服务部(U.S.Dept.of Health and Human Services),“Sequences of Proteins of Immunological Interest(具有免疫学重要性的蛋白质序列)”以及Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917 (1987) (上述文献通过引用全文纳入本文),互相比对时所述定义包括重叠的氨基酸残基或氨基酸残基亚组。尽管如此,应用任一定义指抗体或其变体的CDR均应落入本文所定义和使用的术语范围。合适氨基酸残基包括上文引用的各参考文献中定义的CDR,所述氨基酸残基列于下表1以作比较。包括特定CDR的准确残基编号根据CDR的序列和大小而变化。在抗体的可变区氨基酸序列给定的情况下,本领域技术人员可常规确定哪些残基包含具体CDR。

[0131] 表1.CDR定义1

[0132]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0133] ¹表1中所有CDR定义的编号均按照Kabat等所述的编号规则(见下文)。

[0134] Kabat等还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员能明确地将所述“Kabat编号”系统应用于任何可变区序列,而不依赖序列本身外的任何实验数据。本文所用的“Kabat编号”指Kabat等(1983)美国卫生与公众服务部,“Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学上感兴趣的蛋白质序列)”中所述的编号系统。除非另有说明,提到本发明的抗CXCL13抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中具体氨基酸残基位置的编号时,均按照Kabat编号系统。

[0135] 本文公开的方法中所用的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于:多克隆、单克隆、多特异性、人、人源化、灵长类化或嵌合抗体,单链抗体,表位结合片段如Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗-Id)抗体(包括例如,针对抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的抗-Id抗体)。ScFv分子是本领域已知的,参见例如,美国专利号5,892,019。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型(如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2等)或小类的免疫球蛋白分子。

[0136] 本文所用的术语“重链部分”包括衍生自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包括下组中的至少一个:CH1结构域、铰链(如上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或者其变体或片段。例如,本发明所用的结合多肽可包括含有CH1结构域的多肽链;含有CH1结构域、至少一部分铰链区和CH2结构域的多肽链;含有CH1结构域和CH3结构域的多肽链;含有CH1结构域、至少一部分铰链区和CH3结构域的多肽链,或者含有CH1结构域、至少一部分铰链区、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在另一实施方式中,本文公开的方法中所用的多肽包括含有CH3结构域的多肽链。另外,本文公开的方法中所用的结合多肽可能缺少CH2结构域的至少一部分(例如,所有或部分CH2结构域)。如上所述,本领域技术人员应理解,可修饰这些结构域(例如重链部分),以使它们的氨基酸序列不同于天然产生的免疫球蛋白分子。

[0137] 在本文公开的某些抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物中,多聚体的一条多肽链的重链部分与该多聚体的第二条多肽链相同。或者,本发明的含有重链部分的单体是不同的。例如,各单体可包含不同的靶结合位点,形成例如双特异性抗体。

[0138] 本文公开的治疗方法中所用结合分子的重链部分可衍生自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包含衍生自IgG1分子的CH1结构域和衍生自IgG3分子的铰链

区。在另一个示例中,重链部分可包含部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG3分子的绞链区。在另一个示例中,重链部分可包含部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG4分子的嵌合绞链。

[0139] 本文所用术语“轻链部分”包括衍生自免疫球蛋白轻链,如 κ 或 λ 轻链的氨基酸序列。优选地,所述轻链部分包含VL或CL结构域中的至少一个。

[0140] 本文公开的方法中所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物可根据它们识别或特异性结合的抗原(如本文所述靶多肽(如CXCL13、CXCR5或CXCR3))的表位或部分进行描述或说明。靶多肽与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶多肽可包含单个表位,但通常包含至少两个表位,并可包括任意数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。而且,应该注意到,靶多肽上的“表位”可以是或可包括非多肽元件,例如表位可包括糖侧链。

[0141] 认为抗体的肽或多肽表位的最小尺寸是约4至5个氨基酸。肽或多肽表位优选包含至少7个,更优选至少9个,最优选至少约15至约30个氨基酸。由于CDR能以三联形式识别抗原性肽或多肽,所以包含表位的氨基酸不必定是毗连的,在某些情况下甚至可不在同一肽链上。本发明的方法中使用的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体识别的肽或多肽表位可包含CXCL13、CXCR5或CXCR3中至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、更优选至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、或约15至约30个毗连或非毗连的氨基酸的序列。

[0142] “特异性结合”通常指该抗体通过其抗原结合结构域结合于表位,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间某种程度的互补。按照这一定义,当抗体通过其抗原结合结构域与表位结合比与随机无关的表位结合更容易时,称该抗体“特异性结合”该表位。本文中使用术语“特异性”定性分析某一抗体与某一表位结合的相对亲和性。例如,可认为抗体“A”对某给定表位的特异性高于抗体“B”,或者说抗体“A”结合表位“C”的特异性高于它对相关表位“D”的特异性。

[0143] “优选结合”指与结合相关、相似、同源或类似的表位相比,该抗体更容易特异性结合某表位。因此,与相关表位相比,“优选结合”给定表位的抗体更可能结合该表位,即便这种抗体可能与相关表位发生交叉反应。

[0144] 作为非限制性示例,如果抗体与第一表位结合的解离常数(K_D)低于抗体与第二表位的 K_D ,则可认为抗体优选结合第一表位。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的 K_D 比抗体与第二表位的 K_D 低至少一个数量级,则可认为抗体优选结合第一抗原。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的 K_D 比抗体与第二表位的 K_D 低至少两个数量级,则可认为抗体优先结合第一表位。

[0145] 在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的解离速率(k_{off})比抗体与第二表位的 k_{off} 低,则可认为抗体优选结合第一表位。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的 k_{off} 比抗体与第二表位的 k_{off} 低至少一个数量级,则可认为抗体优选结合第一表位。在另一个非限制性示例中,如果抗体与第一表位结合的 k_{off} 比抗体与第二表位的 k_{off} 低至少两个数量级,则可认为抗体优选结合第一表位。可以说,本文所述的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物结合本文公开的靶多肽(如CXCL13、CXCR5或CXCR5,如人、鼠或者人和鼠CXCL13、CXCR5或CXCR5)或其片段或变体,其解离速率(k_{off})低于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 10^{-2}s^{-1} 或 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 。在某些实施方式中,所述 k_{off} 小于或等于约

3×10^{-2} , 如其中所述抗体是3D2且所述CXCL13是人或小鼠的。在另一个实施方式中, 所述k(off) 小于或等于约 3×10^{-3} , 如其中所述抗体是MAb 5261且所述CXCL13是人或小鼠的。在另一个实施方式中, 所述k(off) 小于或等于约 4×10^{-3} , 如其中所述抗体是MAb 5378且所述CXCL13是人或小鼠的。在一个实施方式中, 可以说, 本发明的抗体结合本文公开的靶多肽(如CXCL13, 如人、鼠、或者人和鼠CXCL13)或其片段或变体, 其解离速率(k(off)) 低于或等于 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 10^{-4}s^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、或 10^{-5}s^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 、 10^{-6}s^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 或 10^{-7}s^{-1} 。

[0146] 可以说, 本文公开的方法中所用抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物结合本文公开的靶多肽(如CXCL13、CXCR5或CXCR5, 如人、鼠或者人和鼠CXCL13、CXCR5或CXCR5)或其片段或变体, 其结合速率(k(on)) 大于或等于 $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、 $10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。在某些实施方式中, 所述k(on) 大于或等于约 5×10^5 , 如其中所述抗体是3D2且所述CXCL13是人的; 或者所述k(on) 大于或等于约 1×10^5 , 如其中所述抗体是3D2且所述CXCL13是小鼠的。在另一个实施方式中, 所述k(on) 大于或等于约 1×10^6 , 如其中所述抗体是MAb 5261且所述CXCL13是人或小鼠的。在另一个实施方式中, 所述k(on) 大于或等于约 1×10^6 , 如其中所述抗体是MAb 5378且所述CXCL13是人或小鼠的。在一个实施方式中, 可以说本发明的抗体结合本文公开的靶多肽(如CXCL13, 如人、鼠或者人和鼠的CXCL13)或其片段或变体, 其结合速率(k(on)) 大于或等于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 或 $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

[0147] 如果抗体优先结合给定表位以至于在某种程度上阻断参考抗体与该表位的结合, 则称该抗体能竞争性抑制参考抗体(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体)与给定表位的结合。竞争性抑制可通过本领域已知的任何方法确定, 例如竞争ELISA实验。可以说, 抗体将参考抗体与给定表位的结合竞争性抑制至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0148] 本文所用的术语“亲和性”指单独表位与免疫球蛋白分子的CDR结合的强度量度。参见例如, Harlow等(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (《抗体: 实验室手册》) (冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 第2版), 第27-28页。本文所用的术语“亲合力”指免疫球蛋白群体和抗原间复合物的总体稳定性, 即免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。参见例如, Harlow, 第29-34页。亲合力既与群体中单独免疫球蛋白分子与特定表位的亲和性相关, 也与免疫球蛋白分子和抗原的价态相关。例如, 二价单克隆抗体和具有高度重复表位结构的抗原例如多聚体之间的相互作用是具有高亲合力的一个例子。

[0149] 本文公开的方法中所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物也可按照其交叉反应性进行描述或说明。本文所用的术语“交叉反应性”指抗体对某一种抗原具有特异性、与第二种抗原发生反应的能力; 它是两种不同抗原性物质之间关联性的量度。因此, 如果抗体与诱导其形成的表位以外的其他表位结合, 则具有交叉反应性。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征, 在某些情况下甚至比原始表位更匹配。

[0150] 例如, 某些抗体具有一定程度的交叉反应性, 因为它们结合相关但不相同的表位, 例如, 与参考表位至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%和至少50%相同(按照本领域已知方法和本文所述方法计算)的

表位。如果抗体不结合与参考表位少于95%、少于90%、少于85%、少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%和少于50%相同性(按照本领域已知方法和本文所述方法计算)的表位,则可以说该抗体的交叉反应性很低或没有交叉反应性。如果某抗体不结合某表位的任何其它类似物、直系同源物或同源物,则可认为该抗体对该表位“高度特异”。

[0151] 本文公开的方法中所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可根据与本发明多肽(例如CXCL13、CXCR5或CXCR3,如人、鼠或者人和鼠的CXCL13、CXCR5或CXCR3)的结合亲和力进行描述或说明。在一些实施方式中,本发明结合亲和性包括解离常数或Kd低于或不高于 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 或 10^{-15}M 的那些。在一个实施方式中,本发明的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子,如抗体或其抗原结合片段结合人CXCL13、CXCR5或CXCR3的Kd小于约 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $5 \times 10^{-10} \text{M}$,如其中所述抗体是MAb 5261且Kd小于或等于约 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 。在另一个实施方式中,本发明的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段)结合鼠CXCL13、CXCR5或CXCR3的Kd小于约 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 至约 $9 \times 10^{-9} \text{M}$,如其中所述抗体是MAb 5261且Kd小于或等于约 $8 \times 10^{-9} \text{M}$ 。

[0152] 本文公开的方法所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以是“多特异性”,例如是双特异性、三特异性或更高特异性,这意味着它能同时识别和结合一种或多种不同抗原(如蛋白质)上出现的两种或更多种不同表位。因此,抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体是“单特异性”还是“多特异性”如“双特异性”,指与结合多肽发生反应的不同表位数量。多特异性抗体可以对本文所述靶多肽的不同表位有特异性,或对靶多肽以及异源表位例如异源多肽或固体支持材料有特异性。

[0153] 本文所用的术语“价态”指结合多肽或CXCL13、CXCR5或CXCR3结合分子,如抗体或其抗原结合片段中存在的潜在结合结构域如抗原结合结构域的数量。各结合结构域特异性结合一种表位。当结合多肽或CXCL13、CXCR5或CXCR3结合分子包含一个以上的结合结构域时,对具有两个结合结构域的抗体来说各结合结构域可特异性结合同一表位时,称为“二价单特异性”,或对具有两个结合结构域的抗体来说特异性结合不同表位时,称为“二价双特异性”。抗体或其抗原结合片段也可以是双特异性,每种特异性为二价(称为“双特异性四价抗体”)。在另一实施方式中,可制备四价小抗体或结构域缺失抗体。

[0154] 双特异性二价抗体及其制备方法描述于例如美国专利号5,731,168;5,807,706;5,821,333;以及美国专利申请公开号2003/020734和2002/0155537,其所有公开内容通过引用纳入本文。双特异性四价抗体及其制备方法描述于例如WO 02/096948和WO 00/44788,其公开内容通过引用纳入本文。通常参见,PCT公开WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360、WO 92/05793;Tutt等,J.Immunol.147:60-69(1991);美国专利号4,474,893、4,714,681、4,925,648、5,573,920和5,601,819;以及Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553(1992)。

[0155] 如前所述,各种免疫球蛋白类别的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。本文所用的术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变区,术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(最靠氨基末端)恒定区结构域。CH1结构域邻近VH结构域,并且位

于免疫球蛋白重链分子绞链区的氨基末端。

[0156] 本文所用术语“CH2结构域”包括用常规编号方案例如大概从抗体的残基244延伸至残基360的重链分子部分(残基244至360,Kabat编号系统;和残基231-340,EU编号系统;参见Kabat EA等)。CH2结构域是独特的,因为它与其它结构域不是紧密配对的。相反,两个N-连接的分支糖链间插在完整天然IgG分子的两个CH2结构域之间。已有充分记载显示CH3结构域从IgG分子的CH2结构域延伸至C末端,并包含大约108个残基。

[0157] 本文所用的术语“绞链区”包括连接CH1结构域和CH2结构域的重链分子部分。该绞链区包括约25个残基并具有挠性,因此使两个N-末端抗原结合区能独立移动。绞链区可细分成三个不同结构域:上部、中部和下部绞链区(Roux等,J.Immunol.161:4083(1998))。

[0158] 本文所用的术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包括可形成二硫键或与第二个巯基桥接的巯基。在大部分天然产生的IgG分子中,CH1和CL区域通过二硫键相连,两条重链通过对应于Kabat编号系统239和242位(EU编号系统是226或229位)的两个二硫键相连。

[0159] 本文所用的术语“嵌合抗体”指其中免疫反应性区域或位点获自或衍生自第一物种,而恒定区(根据本发明,可能是完整、一部分或修饰的)获自第二物种的任何抗体。在某些实施方式中,靶结合区域或位点来自非人来源(如小鼠或灵长动物)而恒定区是人的(例如,本文所述的单克隆抗体(MAb)1476)。

[0160] 本文所用的术语“工程改造的抗体”指通过从具有已知特异性的抗体至少部分置换一个或多个CDR和必要时通过部分构架区置换和序列变化,来改变重链或轻链或二者中可变区的抗体。虽然CDR可衍生自与产生构架区的抗体属于同一类或甚至亚类的抗体,但设想CDR衍生自不同类别的抗体,优选衍生自不同物种的抗体。将来自具有已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR移植到人重链或轻链构架区内形成的工程改造的抗体在本文中称为“人源化抗体”。可能不必定用来自供体可变区的完整CDR代替所有CDR以将一种可变区的抗原结合能力转移至另一可变区。相反,可能只需要转移维持靶结合位点活性所必需的那些残基。在某些实施方式中,所述人源化抗体包含来自供体重链可变结构域的1、2或3个CDR。在另一个实施方式中,所述人源化抗体包含来自供体轻链可变结构域的1、2或3个CDR。

[0161] 进一步认识到,人源化抗体的重链或轻链或二者中可变区内的构架区可仅包含人来源的残基,在这种情况下人源化抗体的这些构架区称为“完全人构架区”。或者,如果需要维持与CXCL13、CXCR5或CXCR3抗原的适当结合或提高该结合,可以在人源化抗体的重链或轻链或二者可变区中人构架区的相应位置内工程改造供体可变区中构架区的一个或多个残基。因此,以此方式工程改造的人构架区包含人和供体构架区残基的混合物,在本文中称为“部分人构架区”。

[0162] 例如,抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的人源化过程可基本按照Winter和同事所述方法进行(Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-327(1988);Verhoeyen等,Science 239:1534-1536(1988)),即用啮齿动物或突变型啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的相应序列。也参见美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762;和5,859,205;其通过引用纳入本文。所得的人源化抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体将在人源化抗体的重链和/或轻链可变区的完全人

构架区内包含至少一个啮齿动物或突变型啮齿动物CDR。在一些情况下,人源化抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的一个或多个可变区的构架区内残基被相应非人(例如,啮齿动物)残基代替(参见例如,美国专利号5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370),在这种情况下所得的人源化抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体将在重链和/或轻链的可变区内包含部分人构架区。

[0163] 而且,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰,以进一步改善抗体性能(例如,获得所需亲和力)。通常,人源化抗体将包含几乎所有的至少一个、通常两个可变区,其中全部或基本上全部的CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,全部或基本上全部的构架区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体还任选包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的Fc。更多的细节参见Jones等,Nature,331:522-525(1986);Riechmann等,Nature,332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992);其通过引用全文纳入本文。因此,所述“人源化”抗体可包括其中明显小于完整的人可变区被来自非人物种的相应序列所取代的抗体。实践中,人源化抗体通常是一些或所有CDR残基和可能的一些构架残基被啮齿动物抗体中相似位点的残基所取代的人抗体。参见例如,美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762;和5,859,205。也参见美国专利号6,180,370和国际公开号WO 01/27160,其中公开了人源化抗体和用于产生对预定抗原的亲性和性提高的人源化抗体的技术。

[0164] 本领域中公开了结合CXCL13的市售抗体,如大鼠抗小鼠MAb 470(R&D系统公司(R&D Systems))和小鼠抗人MAb 801(R&D系统公司)。另外,鼠抗CXCL13抗体公开于美国专利申请公开号20080227704 A1,其通过引用全文纳入本文。单克隆抗CXCL13抗体MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476和3D2公开于标题为“Anti-CXCL13 Antibodies and Methods of Using the Same(抗CXCL13抗体及其使用方法)”的国际申请号PCT/US2011/050177,其于2011年9月1日提交并要求2011年5月2日提交的美国临时申请序列号61/481,645和2011年9月2日提交的美国临时申请序列号61/379,672的优先权,上述文献均通过引用全文纳入本文。

[0165] 单克隆抗体5261包含具有SEQ ID NO:14所列序列的重链可变(VH)结构域和具有SEQ ID NO:19所列序列的轻链可变(VL)结构域。MAb 5261在其重链中包含人IgG γ 1-F同种异型恒定区并在其轻链中包含人 κ 恒定区。单克隆抗体5378包含具有SEQ ID NO:14所列序列的重链可变(VH)结构域和具有SEQ ID NO:19所列序列的轻链可变(VL)结构域。MAb 5378在其重链中包含鼠IgG2a恒定区并在其轻链中包含鼠 κ 恒定区。MAb 5080包含具有SEQ ID NO:14所列序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:21所列序列的VL结构域。MAb 5080在其重链中包含人IgG1恒定区并在其轻链中包含人 κ 恒定区。单克隆抗体1476包含具有SEQ ID NO:10所列序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:15所列序列的VL结构域。MAb 1476在其重链中包含人IgG1恒定区并在其轻链中包含人 κ 恒定区。单克隆抗体3D2包含具有SEQ ID NO:10所列序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:15所列序列的VL结构域。MAb 3D2在其重链中包含鼠IgG1恒定区并在其轻链中包含鼠 κ 恒定区。

[0166] 在一些实施方式中,本文公开的方法利用MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476或3D2抗CXCL13单克隆抗体。

[0167] 在一些实施方式中,本文公开的方法所用抗体包含结合CXCL13的抗CXCL13抗体或

其抗原结合片段、变体或衍生物。在某些实施方式中,抗CXCL13抗体结合人、灵长动物、鼠或者人和鼠的CXCL13。在某些实施方式中,本发明的抗CXCL13抗体是人源化的。在其它实施方式中,抗CXCL13抗体阻断CXCL13结合其受体(如CXCR5或CXCR3)。在某些实施方式中,本发明的抗CXCL13抗体是MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476或3D2或其抗原结合片段、变体或衍生物。在一个实施方式中,本文公开的方法利用了分离的结合分子如抗体或其抗原结合片段、变体和衍生物,所述分子特异性结合与参考抗体所结合的相同的CXCL13、CXCR5或CXCR3表位,如MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476或3D2。在另一个实施方式中,本文公开的方法涉及分离的结合分子如抗体或其抗原结合片段,所述分子特异性结合CXCL13并且竞争抑制参考抗体(如MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476或3D2)与CXCL13(如人、灵长动物、鼠、或者人和鼠的CXCL13)的特异性结合。

[0168] 在某些实施方式中,本文公开的方法中所用结合分子的氨基酸序列与参考抗CXCL13抗体分子的氨基酸序列有至少约80%、约85%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%或约95%序列相同性。在另一个实施方式中,所述结合分子与参考抗体共有至少约96%、约97%、约98%、约99%或100%的序列相同性。在某些实施方式中,所述参考抗体是MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476或3D2。

[0169] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:10或14的CDR1、CDR2或CDR3至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0170] 在另一个实施方式中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VH结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:11、12或13至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0171] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白重链可变区结构域(VH结构域)、基本由其组成或由其组成的,所述VH结构域具有与SEQ ID NO:10或14至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0172] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VH结构域的至少一个CDR除1、2、3、4或5个保守氨基酸取代外,具有与SEQ ID NO:10或14的CDR1、CDR2或CDR3相同的氨基酸序列。

[0173] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VH结构域的至少一个CDR除1、2、3、4或5个保守氨基酸取代外,具有与SEQ ID NO:11、12或13相同的氨基酸序列。

[0174] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:15、19或21的CDR1、CDR2或CDR3至少约

80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0175] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VL结构域的至少一个CDR具有与SEQ ID NO:16、17、18或20至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0176] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VL结构域具有与SEQ ID NO:15、19或21至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0177] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VL结构域的至少一个CDR除1、2、3、4或5个保守氨基酸取代外,具有与SEQ ID NO:15、19或21的CDR1、CDR2或CDR3相同的氨基酸序列。

[0178] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)、基本由其组成或由其组成,所述VL结构域的至少一个CDR除1、2、3、4或5个保守氨基酸取代外,具有与SEQ ID NO:16、17、18或20相同的氨基酸序列。

[0179] 在另一个实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含VL结构域、基本由其组成或由其组成,所述VL结构域具有与SEQ ID NO:15、19或21至少约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的氨基酸序列,其中包含所编码VL结构域的抗CXCL13抗体特异性或优选结合CXCL13。

[0180] 在某些实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14所列氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:19所列氨基酸序列的VL结构域、基本由其组成或由其组成。在一些这类实施方式中,所述抗体在其重链中包含人IgG1恒定区并在其轻链中包含人κ恒定区。

[0181] 在特定实施方式中,本文公开的方法利用了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含VH结构域(包含具有SEQ ID NO:11中所列氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:12中所列氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:13中所列氨基酸序列的CDR3)和VL结构域(包含具有SEQ ID NO:20中所列氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:17中所列氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:18中所列氨基酸序列的CDR3)、基本由其组成或由其组成。在一些这类实施方式中,所述抗体在其重链中包含人IgG1恒定区并在其轻链中包含人κ恒定区。

[0182] 参考抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的合适的生物活性变体可用于本发明的方法中。这类变体将保持抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3母抗体的所需结合性质。本领域中制备抗体变体的方法通常是可得的。

[0183] 诱变和改变核苷酸序列的方法为是本领域中熟知的。参见例如,Walker和Gastra编(1983)Techniques in Molecular Biology(《分子生物学技术》)(纽约麦克米兰出版公

司(MacMillan Publishing Company));Kunkel,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492 (1985);Kunkel等,Methods Enzymol.154:367-382(1987);Sambrook等(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.));美国专利号4,873,192;以及其中引用的参考文献;其通过引用纳入本文。有关不影响感兴趣多肽生物学活性的合适氨基酸取代的指南可参见下述文献中的模型:Dayhoff等(1978),Atlas of Protein Sequence and Structure(《蛋白质序列和结构图册》)(华盛顿特区的国家生物医学研究基金会(Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,D.C.)),第345-352页,通过引用全文纳入本文。Dayhoff等的模型利用单点可接受突变(Point Accepted Mutation,PAM)氨基酸相似矩阵(PAM 250矩阵)来确定合适的保守性氨基酸取代。可能优选保守取代,如用具有相似特性的另一氨基酸替换某种氨基酸。Dayhoff等模型的PAM 250矩阵中教导的保守性氨基酸取代的示例包括但不限于:Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln和Phe↔Trp↔Tyr。

[0184] 构建所述抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段,或感兴趣多肽)的变体时,生成修饰使得变体持续拥有所需特性,如能特异性结合CXCL13、CXCR5或CXCR3(如人、灵长动物、鼠、或者人和鼠的CXCL13、CXCR5或CXCR3)。显然,编码变体多肽的DNA中产生的任何突变一定不能将序列置于阅读框外,优选不产生可生成二级mRNA结构的互补区。参见例如EP专利号EP0075444 B1。

[0185] 测定抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段)的结合特异性的方法包括但不限于:标准竞争结合实验、T细胞或B细胞的免疫球蛋白分泌的监测试验、T细胞增殖实验、凋亡实验、ELISA实验等。参见例如,WO 93/14125;Shi等,Immunity 13:633-642(2000);Kumanogoh等,J Immunol169:1175-1181(2002);Watanabe等,J Immunol 167:4321-4328(2001);Wang等,Blood 97:3498-3504(2001);和Giraudon等,J Immunol 172(2):1246-1255(2004)公开的试验,其都通过引用纳入本文。

[0186] 本文在讨论本文公开的任何具体多肽(包括参考多肽的恒定区、CDR、VH结构域或VL结构域)是否与另一多肽至少约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者甚至约100%相同时,相同性百分比可采用本领域已知的方法和计算机程序/软件测定,例如但不限于BESTFIT程序(威斯康星序列分析软件包,用于Unix系统的第8版,遗传学计算机团队(Genetics Computer Group),威斯康星州麦迪逊科学大道575大学研究园(University Research Park),53711)。BESTFIT利用Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.2:482-489的局部同源性算法,以找到两条序列之间的最佳同源性区段。使用BESTFIT或任何其它序列比对程序来确定某具体序列是否与本发明所述参考序列(例如)95%相同时,当然要设定参数从而在参考多肽序列的全长上计算相同性百分数,并且在参考序列的氨基酸总数中允许多至5%的同源性缺口。

[0187] 出于本发明的目的,可采用史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)同源性搜索算法测定序列相同性百分数,该算法使用仿射缺口搜索,其中缺口开放罚12分,缺口延伸罚2分,BLOSUM矩阵计62分。Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.2:482-489中公开了史密斯-沃特曼同源性搜索算法。变体与参考抗CXCL13抗体(如MAb 5261、MAb 5378、MAb 5080、MAb 1476或3D2)、抗CXCR5或抗CXCR3抗体可以相差例如,少至1-15个氨基酸残基,少至1-10个氨

基酸残基,如6-10个,少至5个,少至4、3、2、或者甚至1个氨基酸残基。

[0188] 能够特异性结合CXCL13、CXCR5或CXCR3并保留所需CXCL13阻断活性的多肽的准确化学结构取决于多种因素。由于分子中存在可离子化的氨基和羧基,可获得酸盐或碱盐或中性形式的特定多肽。置于合适环境条件时保持生物学活性的所有这类制品均落入本文所用的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的定义范围内。另外,可利用糖部分(糖基化)或其它补充分子如脂质、磷酸酯(盐)、乙酰基等通过衍生化来扩充所述多肽的一级氨基酸序列。也可通过与糖偶联进行扩充。这种扩充的某些方面通过生产宿主的翻译后加工系统实现;其它这类修饰可在体外引入。在任何情况下,这类修饰均包括在本文所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的定义范围内,前提是抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的所需特性不被破坏。在不同实验中,预计这类修饰可通过提高或降低多肽活性来定量或定性地影响活性。而且,可通过氧化、还原或其它衍生化方法修饰链内单独氨基酸残基,可切割所述多肽以获得保留活性的片段。不破坏所需特性(如对CXCL13、CXCR5或CXCR3的结合特异性、结合亲和性和/或CXCL13阻断活性)的这类改变不会使该多肽序列从本文所用感兴趣的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的定义中去除。

[0189] 本领域提供有关制备和使用多肽变体的大量指南。在制备抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子如抗体或其抗原结合片段、变体时,本领域技术人员不难确定对天然蛋白质核苷酸或氨基酸序列的哪种修饰将产生适用作本发明方法所用药物组合物的治疗活性组分的变体。

[0190] 可以多种方式使参考抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的恒定区突变从而改变效应物功能。例如,参见美国专利号6,737,056B1和美国专利申请公开号2004/0132101A1,其公开了优化抗体与Fc受体结合的Fc突变。

[0191] 在某些抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体中,可利用本领域已知技术突变Fc部分以降低效应物功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可降低循环的修饰抗体与Fc受体的结合,从而提高肿瘤定位。在其它情况下,与本发明相一致的恒定区修饰可能降低互补物结合,从而缩短所偶联细胞毒素的血清半衰期并减少非特异性结合。可利用恒定区的其它修饰来改变二硫键连接或寡糖部分,能因抗原特异性或抗体灵活性提高而加强定位。无需过多实验,即可容易地利用熟知的免疫学技术测定或定量分析修饰所产生的生理学概况、生物利用度和其它生化作用,如肿瘤定位、生物分布和血清半衰期。

[0192] 通常,本文公开的方法中所用CXCR5或CXCR3结合分子不会激活CXCR5或CXCR3受体(即不是所述受体的激动剂)。

[0193] 本发明的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体也包括修饰的衍生物,例如通过将任何类型的分子共价连接到抗体上使得该共价连接不会防止抗体特异性结合其关联表位。例如但不限于,抗体衍生物包括通过,例如糖基化、乙酰化、PEG化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、连接于细胞配体或其它蛋白质等方法修饰的抗体。通过已知技术可进行任意多种化学修饰,包括但不限于:特异性化学切割、乙酰化、甲酰化等。此外,衍生物可包含一种或多种非经典氨基酸。

[0194] “保守性氨基酸取代”是氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基取代。本领域已定义具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括,具有碱性侧链的

氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者,也可沿所有或一部分编码序列随机引入突变(如通过饱和诱变),并可筛选所得突变体的生物学活性,以鉴定保持活性(例如,对CXCL13、CXCR5或CXCR3的结合特异性、结合亲和性和/或CXCL13阻断活性)的突变体。

[0195] 例如,可能仅在抗体分子的构架区内或仅在CDR区内引入突变。引入的突变可能是沉默或中性错义突变,即对抗体的抗原结合能力没有影响或影响很小。可使用这些突变类型来优化密码子使用,或提高杂交瘤的抗体生成。或者,非中性错义突变可改变抗体的抗原结合能力。大部分沉默和中性错义突变的位置可能位于构架区内,而大部分非中性错义突变的位置可能在CDR内,但这不是绝对的要求。本领域技术人员能够设计和检测具有所需特性,例如抗原结合活性无改变或结合活性有改变(如抗原结合活性提高或抗体特异性改变)的突变分子。诱变后,可通过常规方式表达编码蛋白,并可利用本文所述技术或本领域已知的常规修饰技术测定该编码蛋白的功能和/或生物学活性(例如,免疫特异性结合CXCL13、CXCR5或CXCR3多肽的至少一个表位的能力)。

[0196] 在某些实施方式中,与参考抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体相比,本文公开的方法中所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体包含至少一个优化的互补决定区(CDR)。“优化的CDR”指该CDR已被修饰,并且根据对包含该优化的CDR的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体赋予维持或提高的结合亲和性和/或抗CXCL13活性来选择优化序列。

[0197] 通过在各种免疫细胞(如B细胞、滤泡型辅助T细胞、和近期活化T细胞)中发现的其受体CXCR5,CXCL13诱导了胞内改变,所述改变对维持免疫系统内稳态、淋巴器官发生、白细胞运输和趋化迁移以及次级淋巴组织(如生发中心)的发育是必需的。因此,“抗CXCL13活性”或“CXCL13阻断活性”可包括调节下列一种或多种CXCL13相关活性的活性:阻断CXCL13与其受体(例如CXCR5或CXCR3)的相互作用,抑制B细胞和滤泡型B辅助T细胞迁移至发炎组织,抑制生发中心形成(如在自身免疫疾病情况中),抑制继发性或异位淋巴滤泡;抑制癌细胞增殖和在肿瘤疾病中扩散的能力;或任何其他与表达CXCL13的细胞有关的活性。抗CXCL13活性也能归因于CXCL13表达相关疾病的发生率或严重性下降,包括但不限于某些类型的自身免疫疾病(如多发性硬化、关节炎(如类风湿性关节炎)、慢性胃炎、胃淋巴瘤、移植排斥、干燥综合征(SS)、系统性红斑狼疮(SLE)、丙型肝炎病毒感染中的活性混合冷球蛋白血症(MC)血管炎、幼年型皮炎和重症肌无力)和某些癌症(如伯基特淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、MALT淋巴瘤(如胃MALT淋巴瘤)、癌(如结肠、前列腺、乳腺、胃、食道和胰腺)、和慢性淋巴细胞白血病(CLL))以及其他炎性疾病如螺杆菌(*Helicobacter*)感染诱导的炎性疾病(如胃炎、溃疡和胃粘膜损伤)。如本文他处详述,抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子或可溶性CXCR5或CXCR3还可在N-或C-末端与异源多肽重组融合,或与多肽或其它组合物化学偶联(包括共价和非共价偶联)。例如,抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或可溶性CXCR5或CXCR3可与用作检测试验中标签的分子和效应器分子(如异源多肽、药物、放射性核素或毒素)重组融合或偶联。参见例如,PCT公开WO 92/08495;WO 91/14438;WO 89/12624;美国专利号5,314,995;和EP 396,387。

[0198] 本文所用术语“连接”、“融合的”和“融合”可以互换使用。这些术语指通过包括化学偶联或重组在内的方式将两个或更多元件或组件连接在一起。“框内融合”指以维持原始ORF正确翻译读框的方式,将两个或多个多核苷酸开放阅读框(ORF)连接形成连续的较长ORF。因此,重组融合蛋白是包含两个或多个片段的单一蛋白质,所述片段对应原始ORF编码的多肽(这些片段在自然条件下通常不如此连接)。尽管因此阅读框在融合片段中是连续的,但片段仍可被物理或空间分隔,如框内接头序列。例如,编码免疫球蛋白可变区CDR的多核苷酸可框内融合,但用编码至少一个免疫球蛋白构架区或额外CDR区的多核苷酸间隔开,前提是“融合的”CDR作为连续多肽的一部分共同翻译。

[0199] 本文公开的方法中所用抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体也包括修饰的衍生物,例如通过将任何类型的分子共价连接到抗体上使得该共价连接不会阻止抗体结合CXCL13、CXCR5或CXCR3。例如但不限于,抗体衍生物包括通过,例如糖基化、乙酰化、PEG化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、连接于细胞配体或其它蛋白质等方法修饰的抗体。通过已知技术可进行任意多种化学修饰,包括但不限于:特异性化学切割、乙酰化、甲酰化等。此外,衍生物可包含一种或多种非经典氨基酸。

[0200] 抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可由通过肽键或经修饰肽键即肽等构物而彼此结合的氨基酸组成,并可包含20种基因编码氨基酸以外的氨基酸。例如,可通过天然方法如翻译后加工,或通过本领域熟知的化学修饰技术修饰抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体。这些修饰在基础教材和更具体的专著以及大量研究文献中已有深入描述。可以在抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子的任何位置进行修饰,包括在肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端、或者在某部分如糖上进行修饰。应理解,相同类型的修饰可以在给定抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子的多个位置以相同或不同程度出现。并且,给定的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子可包含许多类型的修饰。抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子可以是分支的,例如因泛素化造成,它们可以是有或没有分支的环状。环状、分支、和分支环状的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子可以由翻译后的天然过程产生或者也可通过合成方法产生。修饰包括乙酰化、酰基化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价结合黄素、共价结合血红素部分、共价结合核苷酸或核苷酸衍生物、共价结合脂质或脂质衍生物、共价结合磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ 羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、十四烷基化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫化、转移RNA介导的氨基酸加入蛋白质如精氨酰化、以及泛素化。(参见例如, *Proteins--Structure and Molecular Properties* (《蛋白质—结构和分子特性》), T.E.Creighton, W.H. 弗里曼公司(W.H.Freeman and Company), 纽约; 第2版(1993); Johnson编(1983) *Posttranslational Covalent Modification of Proteins* (《蛋白质的翻译后共价修饰》) (学术出版社(Academic Press), 纽约), 第1-12页; Seifter等, *Meth.Enzymol.* 182:626-646 (1990); Rattan等, *Ann.NY Acad.Sci.* 663:48-62 (1992))。

[0201] 本文公开的方法包括使用融合蛋白,所述融合蛋白包含抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物和异源多肽。与抗体融合的异源多肽可用于某种功能或用于靶向表达抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3多肽的细胞。

[0202] 在一个实施方式中,本发明融合蛋白包含某一多肽、基本由其组成或由其组成,所

述多肽具有抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体的任何一个或多个VH结构域的氨基酸序列、抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其片段或变体的任何一个或多个VL结构域的氨基酸序列、以及异源多肽序列。

[0203] 在另一个实施方式中,用于本文公开的治疗方法的融合蛋白包含某一多肽、基本由其组成或由其组成,所述多肽具有抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其片段、变体或衍生物的VH结构域中任何一个、两个、三个CDR的氨基酸序列,和/或抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其片段、变体或衍生物的VL结构域中任何一个、两个、三个CDR的氨基酸序列,以及异源多肽序列。在一些实施方式中,所述融合蛋白的VH和VL结构域对应于特异性结合CXCL13、CXCR5或CXCR3中至少一个表位的单一来源抗体(或scFv或Fab片段)。在一些实施方式中,VH结构域或VL结构域的两个、三个、四个、五个、六个或更多个CDR对应于本发明的单一来源抗体(或scFv或Fab片段)。

[0204] 文献中报道的示范性融合蛋白包括T细胞受体(Gascoigne等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:2936-2940(1987));CD4(Capon等,Nature 337:525-531(1989);Traunecker等,Nature 339:68-70(1989);Zettmeissl等,DNA Cell Biol.USA 9:347-353(1990);和Byrn等,Nature 344:667-670(1990));L-选择素(寻靶受体)(Watson等,J.Cell.Biol.110:2221-2229(1990);和Watson等,Nature 349:164-167(1991));CD44(Aruffo等,Cell 61:1303-1313(1990));CD28和B7(Linsley等,J.Exp.Med.173:721-730(1991));CTLA-4(Lisley等,J.Exp.Med.174:561-569(1991));CD22(Stamenkovic等,Cell 66:1133-1144(1991));TNF受体(Ashkenazi等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539(1991);Lesslauer等,Eur.J.Immunol.27:2883-2886(1991);和Peppel等,J.Exp.Med.174:1483-1489(1991));和IgE受体a(Ridgway和Gorman,J.Cell.Biol.卷115,摘要,第1448期(1991))的融合物。

[0205] 如本文它处所述,抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可与异源多肽融合,以提高所述多肽的体内半衰期或在使用本领域已知方法的免疫实验中应用。例如,在一个实施方式中,可将PEG与本发明的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体偶联,以提高其体内半衰期。参见Leong等,Cytokine 16:106(2001);Adv.in Drug Deliv.Rev.54:531(2002);或Weir等,Biochem.Soc.Transactions 30:512(2002)。

[0206] 此外,抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可融合标记物序列如肽,以利于其纯化或检测。在某些实施方式中,标记物氨基酸序列是六组氨酸肽,例如pQE载体(凯杰公司(QIAGEN, Inc.),加利福尼亚州查茨沃斯(Chatsworth)伊顿大街9259号,91311)提供的标签等,其中许多标记可市售获得。如Gentz等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:821-824(1989)所述,六-组氨酸提供了方便的融合蛋白纯化方法。用于纯化的其它肽标签包括但不限于:对应于流感血凝素蛋白衍生表位的“HA”标签(Wilson等,Cell 37:767(1984)),以及“flag”标签。

[0207] 可采用本领域熟知方法制备融合蛋白(参见例如,美国专利号5,116,964和5,225,538)。可凭经验选择进行融合的准确位点,以优化融合蛋白的分泌或结合特性。然后,将编码融合蛋白的DNA转染到宿主细胞中以用于表达。

[0208] 抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可以非偶联形式使用,或者可偶联于各种分子中的至少一种,从而例如改善该分子的治

疗特性、促进靶标检测、或用于患者成像或治疗。可以在纯化前或纯化后,或者在进行纯化时标记或偶联抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)。

[0209] 具体而言,本发明的抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可偶联于治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物反应修饰剂、药物或PEG。

[0210] 本领域技术人员应理解,根据所选的待偶联物质还可采用各种技术组装偶联物。例如,可通过使结合多肽与生物素的活化酯(如生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯)反应以制备生物素偶联物。相似地,可以在偶联剂,如本文所列偶联剂存在下或通过与异硫氰酸酯,优选荧光素-异硫氰酸酯反应制备荧光标记偶联物。以类似方式制备本发明抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的偶联物。

[0211] 抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子(如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可与治疗部分(如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子)偶联。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何物质。

[0212] 将不同部分偶联于抗体(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)的技术是众所周知的,参见例如,Amon等(1985) *Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy* (“癌症治疗中用于免疫靶向药物的单克隆抗体”),收录于 *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (《单克隆抗体和癌症治疗》),Reisfeld等编(ARL公司(Alan R.Liss, Inc.)),第243-56页;Hellstrom等(1987) *Antibodies for Drug Delivery* (“用于药物递送的抗体”),收录于 *Controlled Drug Delivery* (《控制药物递送》),Robinson等编(第2版;马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.)),第623-53页;Thorpe(1985) *Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review* (“癌症治疗中细胞毒性剂的抗体运载体:综述”),收录于 *Monoclonal Antibodies'84: Biological and Clinical Applications* (《单克隆抗体'84: 生物学和临床应用》),Pinchera等编,第475-506页;Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy) “在癌症治疗中治疗性应用放射性标记抗体的分析、结果和展望”,收录于 *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* (《用于检测和治疗癌症的单克隆抗体》),Baldwin等编,学术出版社(Academic Press),第303-16页(1985);和Thorpe等, *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982)。

[0213] 制备和向所需对象给予抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的方法是本领域技术人员熟知的,并可由其容易地确定。给予抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的途径可以是例如口服、胃肠道外、通过吸入或局部。本文所用术语“胃肠道外”包括例如,静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道给药。虽然所有这些给药形式均明确认为在本发明范围内,但给药形式的例子是注射液,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注。通常,合适的注射用药物组合物可包含缓冲剂(如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(如聚山梨酯),以及任选的稳定剂(如人白蛋白)等。然而,在与本文所教授内容相符的其它方法中,可将抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)直接递送到不良细胞群的位点,从而提高患病组织与治疗剂的接触。

[0214] 如本文所述,可以药理学有效量给予抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子),用于体内治疗表达CXCL13的细胞介导的疾病,如B细胞介导的炎症性疾病(包括干燥综合征)。在这方面,应理解,将配制抑制CXCL13活性的物质以利于给药并提高活性物质的稳定性。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含药学上可接受的无毒无菌运载体,如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。出于本申请目的,抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的药理学有效量应被认为指足以实现有效结合靶标和足以实现某一益处例如改善疾病或失调症状或者检测物质或细胞的量。

[0215] 本发明所用的药物组合物包含药学上可接受的运载体,包括例如,离子交换物质、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂,血清蛋白质如人血清白蛋白,缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0216] 胃肠道外给药制剂包括无菌的水性或非水性溶液、悬液和乳液。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射有机酯如油酸乙酯。水性运载体包括例如,水、醇/水溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲介质。在本发明中,药学上可接受的运载体包括但不限于:0.01-0.1M例如0.05M的磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。其它常见的胃肠道外载剂包括磷酸钠溶液、林格右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格溶液或固定油。静脉内载剂包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格右旋糖的那些物质等。也可包含防腐剂和其添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0217] 更具体地,适于注射应用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性时)或分散液,以及用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末。在这种情况下,该组合物必须无菌,并应该是达到存在注射容易性(easy syringability)程度的流体。它应该在制造和储存条件下稳定,并且优选抵抗微生物如细菌和真菌的污染作用而保存。运载体可以是包含如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。可维持合适的流动性,例如通过使用诸如卵磷脂的涂料、分散液情况下通过保持所需粒度以及通过使用表面活性剂。适用于本文所述治疗方法的制剂可参见Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》)(马克出版公司(Mack Publishing Co.))第16版(1980)。

[0218] 也可通过各种抗菌剂和抗真菌剂(如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)实现防止微生物的作用。在某些情况下,组合物中优选包含等张剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可在组合物中包含延迟吸收的物质(如单硬脂酸铝和明胶)以延长可注射组合物的吸收。

[0219] 在任何情况下,制备无菌注射溶液可通过将所需量的活性化合物(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,本身或与其它活性剂联合)掺入含有本文所列一种成分或多种成分组合的合适溶剂,然后根据需要进行过滤除菌。通常,将活性化合物掺入含有碱性分散介质和上述其它所需成分的无菌载剂中制备分散液。在制备无菌注射液所需的无菌粉末时,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,由之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。注射制剂在无菌条件下按照本领域已知方

法加工,装入容器(如安瓿、袋、瓶、注射器或小管)中,并密封。另外,可包装该制剂,并以药盒形式出售,如美国专利申请系列号09/259,337所述。这类制品优选具有标签或药品说明书,表明相关组合物可用于治疗患有或倾向于患有疾病或病症的对象。

[0220] 胃肠道外制剂可以是单次推注剂量,输注或负荷推注剂量,随后是维持剂量。这些组合物可以特定的固定间隔或可变间隔给予,例如每天一次,或“按需”给予。

[0221] 本发明的某些药物组合物可以用可接受的剂型口服给予,包括例如,胶囊、片剂、水性悬液或溶液。某些药物组合物也可通过鼻喷雾或吸入方式给予。这类组合物可制备成盐水溶液,其中采用苜醇或其它合适的防腐剂、吸收促进剂以提高生物利用度,和/或采用其它常规的增溶剂或分散剂。

[0222] 可与运载体材料组合产生单一剂型的抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的量可以根据治疗宿主以及具体的给药模式而变化。该组合物可作为单一剂量、多个剂量或在确定时间段通过输注给予。也可调整给药方案,以提供最优所需响应(例如,治疗或预防响应)。

[0223] 在本发明范围内,抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可按照上述治疗方法给予人或其它动物,其给予量足以产生疗效。抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)可以常规剂型给予所述人或其它动物,所述剂型通过将活性物质与常规的药理学上可接受运载体或稀释剂根据已知技术混合来制备。本领域技术人员应认识到,药理学上可接受运载体或稀释剂的形式和特点由混合的活性成分含量、给药途径和其它熟知变量决定。本领域技术人员还应理解,包含一种或多种抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的混合物可能被证明特别有效。

[0224] “治疗有效剂量或治疗有效量”或者“有效量”指给予时对于患有待治疗疾病患者的治疗带来积极治疗响应的抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的用量。

[0225] 用于治疗表达CXCL13的细胞所介导疾病(如B细胞介导的炎症性疾病(如干燥综合征))的抑制CXCL13活性的物质的治疗有效剂量根据多种不同因素而变化,所述因素包括给药方式、靶标部位、患者生理状态、患者是人或是动物、给予的其它药物和该治疗是预防性治疗或是治疗性治疗。通常,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可采用本领域技术人员已知的常规方法确定治疗剂量,以优化安全性和效能。

[0226] 鉴于本发明的公开内容,本领域普通技术人员无需过多实验即可确定至少一种抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的给予量。影响至少一种抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的给药方式以及相应用量的因素包括但不限于:接受治疗的个体的疾病严重程度、病史、年龄、身高、重量、健康和身体状况。类似地,抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的用量取决于给药方式、对象是否接受单一剂量或多剂量的此种药剂。

[0227] 在一些实施方式中,所给予的抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)的剂量范围是约0.1mg/kg至约100mg/kg,包括但不限于约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约3.5mg/kg、约4mg/kg、

kg、约4.5mg/kg、约5mg/kg、约5.5mg/kg、约6mg/kg、约6.5mg/kg、约7mg/kg、约7.5mg/kg、约8mg/kg、约8.5mg/kg、约9mg/kg、约9.5mg/kg和约10mg/kg。在某些实施方式中,所述剂量给予的范围是约1mg/kg至约10mg/kg。在特定实施方式中,向需要治疗的患者给予约4mg/kg至约5mg/kg的抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)。在一些这类实施方式中,所述物质通过腹膜内注射给予。

[0228] 本发明还提供了抑制CXCL13活性的物质(如抗CXCL13、抗CXCR5或抗CXCR3结合分子)在制造用于治疗B细胞介导的炎症性疾病(包括干燥综合征)药物中的用途。

[0229] 除非另有说明,本发明的实施将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们均在本领域技术范围内。这些技术在文献中已有充分描述。参见例如,Sambrook等编(1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(第2版;冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press));Sambrook等编(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》), (纽约州的冷泉港实验室出版社(Cold Springs Harbor Laboratory, NY));D.N.Glover编,(1985)DNA Cloning(《DNA克隆》),第I和II卷;Gait编(1984)Oligonucleotide Synthesis(《寡核苷酸合成》);Mullis等,美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编(1984)Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》);Hames和Higgins编(1984)Transcription And Translation(《转录和翻译》);Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(《动物细胞培养》)(ARL公司(Alan R.Liss, Inc.));Immobilized Cells And Enzymes(《固定的细胞和酶》)(IRL出版社)(1986);Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning(《分子克隆实践指南》);论文,Methods In Enzymology(《酶学方法》)(学术出版社公司(Academic Press, Inc.), 纽约州);Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(《哺乳动物细胞的转基因载体》)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory));Wu等编,Methods In Enzymology(《酶学方法》),第154和155卷;Mayer和Walker编(1987)Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》)(学术出版社(Academic Press), 伦敦);Weir和Blackwell编(1986)Handbook Of Experimental Immunology(《实验免疫学手册》),第I-IV卷;Manipulating the Mouse Embryo(《小鼠胚胎操作》),纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), (1986);和Ausubel等(1989)Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)(马里兰州巴尔的摩的约翰韦利父子公司(John Wiley & Sons, Baltimore, Md.))。

[0230] 抗体工程的一般原理可参见Borrebaeck编(1995)Antibody Engineering(《抗体工程》)(第2版;牛津大学出版社(Oxford Univ. Press))。蛋白质工程的一般原理可参见Rickwood等编(1995)Protein Engineering, A Practical Approach(《蛋白质工程, 实践方法》), (英国牛津的牛津大学出版社的IRL出版公司(IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.))。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理可参见:Nisonoff(1984)Molecular Immunology(《分子免疫学》)(第2版;马萨诸塞州桑德兰的辛奥尔联合公司(Sinauer Associates, Sunderland, Mass.));和Steward(1984)Antibodies, Their Structure and Function(《抗体的结构和功能》)(Chapman和Hall, 纽约州纽约市)。此外,本领域已知且没

有具体描述的免疫学标准方法通常按照下述文献所述进行:Current Protocols in Immunology (《新编免疫学实验指南》),纽约州的约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons); Stites等编(1994)Basic and Clinical Immunology (《基础和临床免疫学》)(第8版; Appleton和Lange,康涅狄格州的诺沃克(Norwalk, Conn.))和Mishell和Shiigi (编)(1980) Selected Methods in Cellular Immunology (《细胞免疫学的选用方法》)(W.H.弗里曼公司(W.H. Freeman and Co),纽约州)。

[0231] 列出免疫学通用原理的标准参考文献包括:Current Protocols in Immunology (《新编免疫学实验指南》),约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons),纽约州;Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (《免疫学:自身-非自身区别的科学的》)(约翰韦利父子公司,纽约州);Kennett等编(1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (《单克隆抗体,杂交瘤:生物学分析的新领域》)(普莱努公司(Plenum Press),纽约州);Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (《生化和分子生物学实验室技术》中的“单克隆抗体技术”),Burden等编(的埃尔斯威尔公司(Elsevier),阿姆斯特丹);Goldsby等编(2000) Kuby Immunology (《库比免疫学》)(第4版;H.弗里曼公司(H. Freeman & Co.));Roitt等(2001) Immunology (《免疫学》)(第6版;伦敦:摩兹比公司(Mosby));Abbas等(2005) Cellular and Molecular Immunology (《细胞和分子免疫学》)(第5版;埃尔斯威尔健康科学分公司(Elsevier Health Sciences Division));Kontermann和Dubel (2001) Antibody Engineering (《抗体工程》)(施普林格公司(Springer Verlag));Sambrook和Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (《分子克隆:实验室手册》)(冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press));Lewin (2003) Gene VIII (《基因VIII》)(普伦蒂斯霍尔出版社(Prentice Hall) 2003);Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (《抗体:实验室手册》)(冷泉港出版社);Dieffenbach和Dveksler (2003) PCR Primer (《PCR引物》)(冷泉港出版社)。

[0232] 需要注意,术语“一个”或“一种”实体指一种或多种该实体;例如,“一种抗CXCL13抗体”应理解为代表一种或多种抗CXCL13抗体。如此,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0233] 本文所用的所有技术和科学术语具有相同的含义。努力保证所用数值(如含量、温度等)的准确性,但应考虑一些实验误差和偏差。

[0234] 在本说明书和权利要求书中,除非上下文另有说明,术语“包括”、“包含”和“含有”应以非排他性的含义使用。

[0235] 用于指代某一数值时,本文所用术语“约”包括特定量的在一定范围内的变化,所述范围在一些实施方式中是 $\pm 50\%$ 、在一些实施方式中是 $\pm 20\%$ 、在一些实施方式中是 $\pm 10\%$ 、在一些实施方式中是 $\pm 5\%$ 、在一些实施方式中是 $\pm 1\%$ 、在一些实施方式中是 $\pm 0.5\%$ 而在一些实施方式中是 $\pm 0.1\%$,这类变化适用于实施所公开的方法或使用所公开的组合物。

[0236] 应理解,给出数值范围时,除非文中另有明确说明,该范围上下限之间、到下限单位的十分之一的各中间值,以及所述范围的任何其它标注或中间值均包括在本发明范围内。这些小范围的上下限可独立地包括在所述较小范围中,也包括在本发明范围中,除非所

述范围中存在任何明确排除的界限。设定范围包含一个或两个限值时,本发明也包括排除所述限值之一或两个的范围。

[0237] 通过说明的方式,而非限制性方式提供以下实施例。

实施例

[0238] 实施例1

[0239] 对干燥综合征的小鼠模型中抗CXCL13抗体的评价

[0240] 干燥综合征的鼠模型。使用雌性NOD/ShiLtJ (NOD) 小鼠以评估干燥综合征中抗CXCL13抗体的效果。使用100 μ g的鼠抗CXCL13单克隆抗体 (MAb) 5378 (n=9) 或对照IgG2a (n=8) 治疗小鼠,从4周龄时开始每周治疗3次持续12周。抗体经腹腔注射给予。在16周龄时处死所有小鼠。

[0241] 在治疗前并在最初的抗CXCL13或对照IgG2a注射后间隔50天收获来自NOD小鼠的血清。唾液组织在安乐死后收获。简言之,处死小鼠并暴露唾液组织。通过外科手术移出所有组织并将其置于RPMI 1640培养基 (MediatechCellgro) 中,所述培养基配备有5%胎牛血清和1%青霉素和链霉素(用于细胞分选)。在福尔马林中固定组织或冷冻组织以方便分别进行免疫组化(IHC)和mRNA分析。

[0242] 使用RNeasy plus小试剂盒(凯杰公司(Qiagen))从全颌下组织中提取RNA。使用iScript试剂盒(伯乐公司(BioRad))进行cDNA合成。为定量转录水平,使用前文所述SYBR绿对鼠唾液组织进行qPCR(Lee,B.P.,等,(2006) J Immunol 176:5276-5283;Zhong,X.,等,(2007) Eur J Immunol 37:2405-2410)。引物如下:

[0243] CXCL13:正向:5' TGG CTG CCC CAA AAC TGA 3',反向:TGG CAC GAG GAT TCA CAC AT 3',

[0244] CXCR5:正向:5' TGG GCT CCA TCA CAT ACA AT 3',反向:5' GGG AAT CTC CGT GCT GTT AC 3' (Schiffer,L.,等,(2008) J Immunol 180:1938-1947)

[0245] CD19:正向:5' ACC AGT ACG GGA ATG TGC TC 3',反向:5' GAC TTG AAT GCG TGG ATT T 3',和

[0246] CD4:正向:5' TTC GCC TTC GCA GTT TGA TC 3',反向:5' CAC CCA CAA CTC CAC CTC CT 3'。

[0247] 所有样品都重复两次且表达对肌动蛋白标准化。斯氏T检验用于确定统计学显著性。

[0248] 抗CXCL13抗体治疗减轻了小鼠中唾液腺炎症。图1A显示了在16周龄处死的用来自三种代表性同种型对照(左图)和三种代表性抗CXCL13抗体(右图)治疗的小鼠中唾液组织的H&E染色图像。对同种型对照和抗CXCL13抗体样品的颌下组织中淋巴细胞病灶的数目进行了计数。结果如图1B所述。这些结果显示,如H&E染色所示,与使用对照抗体治疗的小鼠相比,使用抗CXCL13抗体治疗的小鼠的颌下组织中淋巴细胞病灶的数目减少。差异是统计学显著的($p<0.05$)。

[0249] 小鼠颌下唾液腺组织中的CXCR5表达。图2显示了使用抗CXCL13抗体和同种型对照治疗的小鼠中CXCR5的mRNA表达。与接受对照的那些小鼠相比,使用抗CXCL13抗体治疗的小鼠显示出颌下唾液腺组织中的CXCR5受体数目减少。差异是统计学显著的($p<0.05$)。由于

CXCR5是B细胞标记,使用抗CXCL13抗体治疗后CXCR5表达的降低暗示干燥综合征中CXCL13在介导B细胞至唾液组织的过程中起作用。

[0250] 小鼠颌下唾液腺组织中的CD19表达。图3显示了使用抗CXCL13抗体和同种型对照治疗的小鼠中CD19的mRNA表达。这些结果显示,与使用同种型对照治疗的那些小鼠相比,使用抗CXCL13治疗的小鼠中CD19表达显著降低($p<0.05$)。这些结果证明,使用抗CXCL13抗体治疗后唾液组织中B细胞浸润减少。由于CD19是B细胞标记物,使用抗CXCL13抗体治疗后CD19表达的降低暗示干燥综合征中CXCL13在介导B细胞至唾液组织的过程中起作用。

[0251] 小鼠颌下唾液腺组织中的CD4表达。图4显示了使用抗CXCL13抗体和同种型对照治疗的小鼠中CD4的mRNA表达。这些结果显示,与使用同种型对照治疗的那些小鼠相比,使用抗CXCL13治疗的小鼠中CD4表达并未发生显著变化。这些结果表明,由CD4转录本水平确定,在抗CXCL13抗体存在的情况下,颌下组织的T细胞浸润并未发生显著减少。

[0252] 以上具体实施方式的描述完全揭示了本发明的一般性质,通过应用本领域技术范围内的知识,他人无需过多实验即能很容易地在不背离本发明总体理念的前提下就各种应用改良和/或修改这些具体实施方式。因此,基于本文所列出的教导和指南,应理解为这些修改和改良落入所公开实施方式的等同形式的含义和范围内。应当理解本文中的措词和术语仅仅是描述性的而非限制性的,从而本说明书中的术语或措词可由本领域技术人员根据所述教导和指南解读。

[0253] 本发明的宽度和范围不应受限于任何上述示例性实施方式,而应仅根据下列权利要求书及其等同项来定义。

[0254] 本说明书中涉及的所有出版物和专利申请指示本发明涉及领域技术人员的水平。所有发表物和专利申请通过引用纳入本文,就好像将各篇单独的发表物或专利申请具体和单独地通过引用纳入本文那样。

序列表

<110> E·S·史密斯 (Smith, Ernest)
M·左德勒 (Zauderer, Maurice)

<120> 用于治疗B细胞介导的炎症疾病的方法

<130> 50827-430529

<150> 61/606,049

<151> 2012-03-02

<160> 31

<170> FastSEQ For Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1201

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (79)... (408)

<400> 1

```
gagaagatgt ttgaaaaaac tgactctgct aatgagcctg gactcagagc tcaagtcga 60
actctacctc cagacaga atg aag ttc atc tgg aca tct ctg ctt ctc atg 111
Met Lys Phe Ile Ser Thr Ser Leu Leu Leu Met
1 5 10
```

```
ctg ctg gtc agc agc ctc tct cca gtc caa ggt gtt ctg gag gtc tat 159
Leu Leu Val Ser Ser Leu Ser Pro Val Gln Gly Val Leu Glu Val Tyr
15 20 25
```

[0001]

```
tac aca agc ttg agg tgt aga tgt gtc caa gag agc tea gtc ttt atc 207
Tyr Thr Ser Leu Arg Cys Arg Cys Val Gln Glu Ser Ser Val Phe Ile
30 35 40
```

```
cct aga cgc ttc att gat cga att caa atc ttg ccc cgt ggg aat ggt 255
Pro Arg Arg Phe Ile Asp Arg Ile Gln Ile Leu Pro Arg Gly Asn Gly
45 50 55
```

```
tgt cca aga aaa gaa atc ata gtc tgg aag aag aac aag tea att gtg 303
Cys Pro Arg Lys Glu Ile Ile Val Trp Lys Lys Asn Lys Ser Ile Val
60 65 70 75
```

```
tgt gtg gac cct caa gct gaa tgg ata caa aga atg atg gaa gta ttg 351
Cys Val Asp Pro Gln Ala Glu Trp Ile Gln Arg Met Met Glu Val Leu
80 85 90
```

```
aga aaa aga agt tct tea act cta cca gtt cca gtg ttt aag aga aag 399
Arg Lys Arg Ser Ser Ser Thr Leu Pro Val Pro Val Phe Lys Arg Lys
95 100 105
```

```
att ccc tga tctgatatt tccactaaga acacctgcat tcttccetta 448
Ile Pro
```

```
tccttgcctc ggattttagt ttgtgctta gttaaatctt ttccaggaaa aagaacttcc 508
ccatataaat aagcatgaga ctatgtaaaa ataaccttgc agaagctgat gggcacaact 568
cnagcttctt cactcacagc acctatata cacttggagt ttgcattctt attcatcagg 628
gaggaaagtt tctttgaaa tagttattca gttataagta atacaggatt attttgatta 688
tatacttggt gtttaagtgt taaaatttct tagaaaacaa tggaaatgaga atttaagcct 748
caaatittgaa catgttgctt gaattaagaa gaaaattatg gcatatatta aaagcaggct 808
tctatgaagc actcaaaaag ctgcctggga ggcagatgga acttgcgcct gtcaagaggc 868
aaaggaatcc atgtagtaga tatectctgc ttaaaaaact actacggagg agaattaaat 928
cctactttta aagaatttct ttataaaatt tactgtctna gattaatagc attcgaagat 988
ccccagactt catagaatac tcagggaagc catttaagg gtgatgtaca catgtatcct 1048
ttcacacatt tgccttgaca aacttcttct actcacatct ttttcaatga ctttttttgt 1108
gggggggggg gccgggggga ctctgggtat taattcttta atgattccta taaatctaat 1168
gacattcaat aaagttgagc aaacatttta ctt 1201
```

<210> 2

<211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2
 Met Lys Phe Ile Ser Thr Ser Leu Leu Leu Met Leu Leu Val Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Ser Pro Val Gln Gly Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr Ser Leu Arg
 20 25 30
 Cys Arg Cys Val Gln Glu Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile
 35 40 45
 Asp Arg Ile Gln Ile Leu Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu
 50 55 60
 Ile Ile Val Trp Lys Lys Asn Lys Ser Ile Val Cys Val Asp Pro Gln
 65 70 75 80
 Ala Glu Trp Ile Gln Arg Met Met Glu Val Leu Arg Lys Arg Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Leu Pro Val Pro Val Phe Lys Arg Lys Ile Pro
 100 105

<210> 3
 <211> 1162
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (33)... (362)

<400> 3
 gagctaaagg ttgaactcca cctccaggca ga atg agg ctc agc aca gca acg 53
 Met Arg Leu Ser Thr Ala Thr
 1 5
 ctg ctt ctc ctc ctg gcc agc tgc ctc tct cca ggc cac ggt att ctg 101
 Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Cys Leu Ser Pro Gly His Gly Ile Leu
 10 15 20
 gaa gcc cat tac aca aac tta aaa tgt agg tgt tct gga gtg att tca 149
 Glu Ala His Tyr Thr Asn Leu Lys Cys Arg Cys Ser Gly Val Ile Ser
 25 30 35
 act gtt gtc ggt cta aac atc ata gat cgg att caa gtt acg ccc cct 197
 Thr Val Val Gly Leu Asn Ile Ile Asp Arg Ile Gln Val Thr Pro Pro
 40 45 50 55
 ggg aat ggc tgc ccc aaa act gaa gtt gtg atc tgg acc aag atg aag 245
 Gly Asn Gly Cys Pro Lys Thr Glu Val Val Ile Trp Thr Lys Met Lys
 60 65 70
 aaa gtt ata tgt gtg aat cct cgt gcc aaa tgg tta caa aga tta tta 293
 Lys Val Ile Cys Val Asn Pro Arg Ala Lys Trp Leu Gln Arg Leu Leu
 75 80 85
 aga cat gtc caa agc aaa agt ctg tct tca act ccc caa gct cca gtg 341
 Arg His Val Gln Ser Lys Ser Leu Ser Ser Thr Pro Gln Ala Pro Val
 90 95 100
 agt aag aga aga gct gcc tga agccactatc atctcaaaag acacacctgc 392
 Ser Lys Arg Arg Ala Ala
 105
 accctttttt ttatccctgc tctgaatttt agatatgttc ttagttaaag aatttccaag 452
 aaaataactc cccctctaca acaaacatga ctgtaggtaa aacaaagcaa aaacaaacaa 512
 gcaaaccaac aaactaaaaa aaacccaatc ctgcaggagc tgagagggaa tgctcaagct 572
 ccgttgcata cccaacccac atccttggtc cttaagaaaag gctatttgag aacaggcatt 632
 tagtgacaae ccacttcaga tgcattgtgt aatagatctg ttgtttaatg ttaaaactatc 692
 ctgattgtgc gaggaatgaa aaacctacat gtcaaatgtg aacttgtagc tegtactaac 752
 aagaggtttg cgagatggac ttcagttatt ttgcaccctt gtaaaacgca ggcttccaaa 812
 atagtcleca gaaggttccl gggaagctgg tgcattgcca tcatgaggtg gtgcaaaagca 872
 ggtctccttt agagaaaagc ttctggggg aaacagtcct actttgaaag gttgcttgta 932
 taagatttat tctcttgcac taaaaccagt aacaattgaa agatcctcag cttaaaggte 992
 caggctcttc agcagtatac aaatatattc ctttgcactg tgacctgat gatctatatt 1052
 tatfatctat atctttcaca cagacaaaat accagcctct tgtatcagat tctttaatgt 1112
 ttctatttca tctggtgtca ttcaataaat gtaatcaaat gttttgctta 1162

[0002]

<210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 4
 Met Arg Leu Ser Thr Ala Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ser Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Gly His Gly Ile Leu Glu Ala His Tyr Thr Asn Leu Lys Cys
 20 25 30
 Arg Cys Ser Gly Val Ile Ser Thr Val Val Gly Leu Asn Ile Ile Asp
 35 40 45
 Arg Ile Gln Val Thr Pro Pro Gly Asn Gly Cys Pro Lys Thr Glu Val
 50 55 60
 Val Ile Trp Thr Lys Met Lys Lys Val Ile Cys Val Asn Pro Arg Ala
 65 70 75 80
 Lys Trp Leu Gln Arg Leu Leu Arg His Val Gln Ser Lys Ser Leu Ser
 85 90 95
 Ser Thr Pro Gln Ala Pro Val Ser Lys Arg Arg Ala Ala
 100 105

<210> 5
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)

<400> 5
 Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr His Leu Arg Cys Arg Cys Val Gln Glu
 1 5 10 15
 Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile Asp Arg Ile Gln Ile Ser
 20 25 30
 Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu Ile Ile Val Trp Lys Lys
 35 40 45
 Asn Lys Ser Val Val Cys Val Asp Pro Gln Ala Glu Trp Ile Gln Arg
 50 55 60
 Ile Met Glu Met Leu Arg Lys Lys Ser Ser Ser Thr Pro Pro Val Pro
 65 70 75 80
 Val Phe

[0003]

<210> 6
 <211> 2902
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (177)... (1295)

<400> 6
 aaaaaaaaa agtgatgagt tgtgaggcag gtgcggccc tactgectca ggagacgatg 60
 cgcagctcat ttgcttaaat ttgcagctga cggetgccac ctctctagag gcacctggcg 120
 gggagcctct caacataaga cagtgaccag tctggtgact cacagccggc acagcc atg 179
 Met
 1
 aac tac ccg cta acg ctg gaa atg gac etc gag aac ctg gag gac ctg 227
 Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp Leu
 5 10 15
 ttc tgg gaa ctg gac aga ttg gac aac taf aac gac acc tcc ctg gtg 275
 Phe Trp Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu Val
 20 25 30
 gaa aat cat ctc tgc cct gcc aca gag ggg ccc etc atg gcc tcc ttc 323
 Glu Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala Ser Phe
 35 40 45
 aag gcc gtg ttc gtg ccc gtg gcc tac agc etc atc ttc etc ctg gcc 371
 Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile Phe Leu Leu Gly
 50 55 60 65
 gtg atc gcc aac gtc ctg gtg ctg gtg atc ctg gag cgg cac cgg cag 419

[0004]

Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile Leu Glu Arg His Arg Gln	
70 75 80	
aca cgc agt tcc acg gag acc ttc ctg ttc cac ctg gcc gtg gcc gac	467
Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala Asp	
85 90 95	
ctc ctg ctg gtc ttc atc ttg ecc ttt gcc gtg gcc gag gcc tct gtg	515
Leu Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser Val	
100 105 110	
ggc tgg gtc ctg ggg acc ttc ctg tgc aaa act gtg att gcc ctg cac	563
Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu His	
115 120 125	
aaa gtc aac ttc tac tgc agc agc ctg ctg ctg gcc tgc atc gcc gtg	611
Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val	
130 135 140 145	
gac cgc tac ctg gcc att gtc cac gcc gtc cat gcc tac cgc cac cgc	659
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His Arg	
150 155 160	
cgc ctg ctg tcc atc cac atc acc tgt ggg acc atc tgg ctg gtg gcc	707
Arg Leu Leu Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val Gly	
165 170 175	
ttc ctg ctt gcc ttg cca gag att ctg ttc gcc aaa gtc agc caa gcc	755
Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val Ser Gln Gly	
180 185 190	
cat cac aac aac tcc ctg cca cgt tgc acc ttc tcc caa gag aac caa	803
His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn Gln	
195 200 205	
gca gaa acg cat gcc tgg ttc acc tcc cga ttc ctg tac cat gtg gcc	851
Ala Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val Ala	
210 215 220 225	
gga ttc ctg ctg ccc atg ctg gtg atg gcc tgg tgc tac gtg ggg gta	899
Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly Val	
230 235 240	
gtg cac agg ttg cgc cag gcc cag cgg cgc cct cag cgg cag aag gca	947
Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln Lys Ala	
245 250 255	
gtc agg gtg gcc atc ctg gtg aca agc atc ttc ttc ctg tgc tgg tca	995
Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu Cys Trp Ser	
260 265 270	
ccc tac cac atc gtc atc ttc ctg gac acc ctg gcc agg ctg aag gcc	1043
Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys Ala	
275 280 285	
gtg gac aat acc tgc aag ctg aat gcc tct ctg ccc gtg gcc atc acc	1091
Val Asp Asn Thr Cys Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile Thr	
290 295 300 305	
atg tgt gag ttc ctg gcc ctg gcc cac tgc tgc ctg aac ccc atg ctg	1139
Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met Leu	
310 315 320	
tac act ttc gcc gcc gtg aag ttc cgc agt gac ctg tgc cgg ctg ctg	1187
Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu Ser Arg Leu Leu	
325 330 335	
acg aag ctg gcc tgt acc gcc cct gcc tcc ctg tgc cag ctg ttc cct	1235
Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro	
340 345 350	
agc tgg cgc agg agc agt ctg tct gag tca gag aat gcc acc tct ctg	1283
Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu	
355 360 365	
acc acg ttc tag gtccagtg ccccttttat tgcgtcittt ccttggggca	1335

Thr Thr Phe
370

```

ggcagtgatg ctggatgctc cttecaacag gagctgggat cetaagggct cacegtggct 1395
aagagtgtcc taggagtatc ctcatitggg gtagctagag gaaccaacc ccatttctag 1455
aacatccctg ccagctcttc tgccggccct ggggctagge tggagcccag ggagcggaaa 1515
gcagctcaaa ggcacagtga agctgttctc taccatctg caccctccctg ggctgagaga 1575
acctcacgca cctccatcc taatcatcca atgctcaaga aacaacttct acttctgecc 1635
ttgccaaagg agagcgccctg cccctcccag aacacactcc atcagcttag gggctgetga 1695
cctccacage ttccctctc tectctgtcc cactgtcaa acaaagccag aagctgagca 1755
ccaggggatg agtggaggtt aaggetgagg aaaggccagc tggcagcaga gtgtggcctt 1815
cggacaactc agtccctaaa aacacagaca ttctgccagg cccccaagcc tgcagtcatc 1875
ttgaccaagc aggaagctca gactggttga gtacaggtag ctgcccttgg ctctgaccga 1935
aacagcgctg ggaccacccc atgtaccgg atcctgggig gctgtcaggc agggctgact 1995
ctaggtgtccc ttggaggcca gccagtgaec tgagggaagc tgaaggccga gaagcaagaa 2055
agaaaccgga cagaggggaag aaaagagctt tcttcccga cccaaggag ggagatggat 2115
caatcaaac ccgctgtccc ctccgccagg cgagatgggg tgggtggag aactcctagg 2175
gtggttgggt ccaggggatg ggaggtgtgt gccattgatg gggaaggagg ctggcttgtc 2235
cctcctcac tcccttcca taagctatag accegaggaa actcagagtc ggaacggaga 2295
aaggtggact ggaaggggcc cgtgggagtc atctcaacca tcccctccgt ggcataacct 2355
taggcaggga agtgaanaa acacactgag gcagggaagt cccagggccc cagggaagccg 2415
tgccctgccc ccgtgaggat gtcactcaga tggaaaccga ggaagctgct ccgtgcttgt 2475
ttgtcacctt ggggtgtggg aggcccgtec ggcagttctg ggtgtcctc accacctccc 2535
cagccttga tcaggtgggg agtcagggac cctgtccctt gtccactca agccaagcag 2595
ccaagctect tgggagggcc cactggggaa ataacagctg tggtcacgt gagagtgtct 2655
tcacggcagg acaacagga agccctaaga cgtccctttt ttctctgagt atctcctcgc 2715
aagctgggta atgatgggg gagtetgaag cagatgcaaa gaggcaagag gctggatttt 2775
gaattttttt tttataaaaa aggcacctat aaaacaggtc aatacagtac aggcagcaca 2835
gagacccccc gaacaagcct aaaaatgttt tcaaaataaa aaccaagaag atgtcttcac 2895
atatgtgt 2902

```

<210> 7
<211> 372
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

[0005]

```

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> 8

<211> 2614

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (44)... (1168)

<400> 8

cgacatcaga caglgaccag cctggtagcg cagagcigca gct atg aac tac cca 55
 Met Asn Tyr Pro
 1
 cta acc ctg gac atg ggc tcc atc aca tac aat atg gat gac etg tac 103
 Leu Thr Leu Asp Met Gly Ser Ile Thr Tyr Asn Met Asp Asp Leu Tyr
 5 10 15 20
 aag gaa ctg gcc ttc tac agt aac agc acg gag att ccc cta cag gac 151
 Lys Glu Leu Ala Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Glu Ile Pro Leu Gln Asp
 25 30 35
 agt aac ttc tgc tct aca gtc gag gga ccc tta ctg acg tcc ttt aag 199
 Ser Asn Phe Cys Ser Thr Val Glu Gly Pro Leu Leu Thr Ser Phe Lys
 40 45 50
 [0006] gcg gta ttc atg cct gtg gcc tac agc ctc atc ttc ctc ctg ggt atg 247
 Ala Val Phe Met Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile Phe Leu Leu Gly Met
 55 60 65
 atg gga aac atc ctg gtg ctg gta atc ctg gag agg cac cgg cac act 295
 Met Gly Asn Ile Leu Val Leu Val Ile Leu Glu Arg His Arg His Thr
 70 75 80
 cgg agc tca acc gag acc ttc ctg ttc cac ctc gca gta gcc gac ctt 343
 Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu
 85 90 95 100
 ctc tta gtc ttc atc ctg cct ttt gca gtg gct gag ggc tct gtg ggt 391
 Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser Val Gly
 105 110 115
 tgg gtc cta ggg acc ttc ctc tgc aaa act gtg atc gct ctg cac aag 439
 Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu His Lys
 120 125 130
 atc aat ttc tac tgc agc agc ctg ctg ctg gcc tgt ata gct gta gac 487
 Ile Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val Asp
 135 140 145
 egg tac cta gcc atc gtc cat gct gtt cac gcc tac cgc cgc cgt cga 535
 Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg Arg Arg Arg
 150 155 160
 ctc ctc tcc atc cac atc acc tgc acg gcc att tgg ctg gcc ggc ttc 583
 Leu Leu Ser Ile His Ile Thr Cys Thr Ala Ile Trp Leu Ala Gly Phe
 165 170 175 180
 ctg ttc gcc tta ccg gaa ctc ctc ttt gcc aag gtt ggc caa cct cat 631
 Leu Phe Ala Leu Pro Glu Leu Leu Phe Ala Lys Val Gly Gln Pro His
 185 190 195
 aac aac gac tcc tta cca cag tgc acc ttc tcc cag gaa aac gaa gcg 679
 Asn Asn Asp Ser Leu Pro Gln Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn Glu Ala
 200 205 210

	gaa act aga gcc tgg ttc acc tcc cgt ttc ctc tac cac atc ggg ggc Glu Thr Arg Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Ile Gly Gly 215 220 225	727
	ttc cta cta ccg atg ctt gtg atg gga tgg tgt tac gtg ggc gtg gtc Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly Val Val 230 235 240	775
	cac agg cta ctg cag gcc cag cgg cgc cct cag cgg cag aag gcg gtc His Arg Leu Leu Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln Lys Ala Val 245 250 255 260	823
	agg gtg gcc att tta gtg aca agc att ttc ttc ctc tgc tgg tgc ccc Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu Cys Trp Ser Pro 265 270 275	871
	tac cac att gtc atc ttc cta gat aca ctg gag agg ctg aag gct gtg Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Glu Arg Leu Lys Ala Val 280 285 290	919
	aat agc agc tgc gag ctg agt ggc tat ctc tct gtg gcc atc acc ttg Asn Ser Ser Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Leu Ser Val Ala Ile Thr Leu 295 300 305	967
	tgt gaa ttc ctg ggc ctg gca cac tgc tgt ctc aat ccc atg ctc tac Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr 310 315 320	1015
	acc ttc gct ggc gta aag ttc cgc agt gac ctc tct cgg ctt ctg acc Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu Ser Arg Leu Leu Thr 325 330 335 340	1063
	aag ctg ggc tgt gct ggc ccg gcc tcc ctt tgc caa ctt ttc ccc aac Lys Leu Gly Cys Ala Gly Pro Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Asn 345 350 355	1111
[0007]	tgg cgc aag agt agt ctc tct gag tca gag aat gct act tcc ctc acc Trp Arg Lys Ser Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr 360 365 370	1159
	acc ttc tag atcccgaag tctcggggcc cctgtctgtt tctgttttcc Thr Phe	1208
	ttgggaggat aaagtgttg eggaacccat ccaactcgag ctggggccag tgtccccaga tgggaaagct agataaaact tctcaaacit tcccaaaagg gaaagcagcc caaaggcaca gcaagctata tccaggccac ctgtatcacc ttatgtgaag agaactccat acacttcca tctaaccag ctaaaagctaa gctcagcttt atttcttctt ggccataggg acaaccacct ctgctgtggc ccacagtctc atcttctctc tgattatgag cccagactct cctcccagaa tgtattccat catcttaaag actacaggct gccacagcta cccaccacac ctataccaca gaggaatage cagctggcgg cggcagacta tggccttaat gtgcctgtct cataaataca gacttcaigc cagaccttca accgtgcttt tctcttaacc aagcagaaag ctgaaaccga tctactttag gtactgtctt ggttccaacc taaccagcat tgggtcagcc ccatgttact ggatcttggg ttacagactg agggcaagtt ccagaaggtt ctggaagcta gccagtatcc taagaagagt aaaggccaag ccagcaggaa agaggccag tggaaaagtg gaaagacacc ttttccagcc tctaaggaag aacaagtaaa aatcaaaccc agctgtcttc tccaccaat gtaccaaagc ttacagactg gtggggaaat gagatccagg gccctcgtgg attctacgca ccaatgggga aggaagccaa ctgacctggg gaaagcaaga tagcaaatgt gtcctagcct cgagagaggg gacacctagc taagagaatg acgacagagg ttctgtcttt cattaggcag aggcaatata agaagccaac ctgggcaggc aagtcctcaa accccaggaa ggcagtatcc tgccccctgg agggtaaccac tcacatggaa ccagagggaag ctgctccatg catacatagg ggaagttagc aggcattctt gactcggct tcctcccage caccgatctg ggggcgtggg ggtaggaagc agagtgtcct agtaccacac aagccaaccg tacaagctcc ctgggggac ccactgggga aaccaatgct atagcttcag agactgtatc ctcatgtcag aaccgtgaag acacctgggg accccctttt ctgctccag catccaacaa ccagctggga agaggcaaac cgggcacaga aataaaaatg caagagatgg catttttgaa ttttctcttt ttaataaaaa ggcacctata aaacaggtca atacaggcag agacccccgg aacaagccta aaaagtgttt caaaataaaa acaggaagat gtcttc	1268 1328 1388 1448 1508 1568 1628 1688 1748 1808 1868 1928 1988 2048 2108 2168 2228 2288 2348 2408 2468 2528 2588 2614
	<210> 9	
	<211> 374	
	<212> PRT	
	<213> 小家鼠	
	<400> 9	

[0008]

```

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> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H1609; 3D2抗体的VH结构域

<400> 10

```

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

```

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H1609-CDR1

<400> 11
 Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
 1 5

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H1609-CDR2

<400> 12
 His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Arg Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H1609-CDR3

<400> 13
 Ile Ala Gly Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

[0009]

<210> 14
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H5188/H2177; MAb 5378和5261的VH结构域

<400> 14
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Arg Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Ala Gly Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Trp Phe Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> L0293; MAb 3D2的VL结构域

<400> 15

```

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

```

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> L0293-CDR1

```

<400> 16
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Ser Gly Ile Ser Phe Met His
1      5      10      15

```

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> L0293-CDR2

[0010]

```

<400> 17
Arg Ala Ser Asp Leu Glu Ser
1      5

```

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> L0293-CDR3

```

<400> 18
Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Trp Thr
1      5

```

<210> 19
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> L5153/L5140; MAb 5378和5261的VL结构域

```

<400> 19
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 Asp Asn Met
20     25     30
Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35     40     45
Lys Leu Leu Ile Phe Arg Ala Ser Asp Leu 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 Asn
85     90     95

```

Lys Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> L5153-CDR1

<400> 20
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Met Gly Ile Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> L5055; Mab 5080的VL结构域

<400> 21
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 Asp Asn Ser
20 25 30
Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Phe Arg Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Gly Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg 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 Asn
85 90 95
Lys Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

[0011]

<210> 22
<211> 368
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22
Met Val Leu Glu Val Ser Asp His Gln Val Leu Asn Asp Ala Glu Val
1 5 10 15
Ala Ala Leu Leu Glu Asn Phe Ser Ser Ser Tyr Asp Tyr Gly Glu Asn
20 25 30
Glu Ser Asp Ser Cys Cys Thr Ser Pro Pro Cys Pro Gln Asp Phe Ser
35 40 45
Leu Asn Phe Asp Arg Ala Phe Leu Pro Ala Leu Tyr Ser Leu Leu Phe
50 55 60
Leu Leu Gly Leu Leu Gly Asn Gly Ala Val Ala Ala Val Leu Leu Ser
65 70 75 80
Arg Arg Thr Ala Leu Ser Ser Thr Asp Thr Phe Leu Leu His Leu Ala
85 90 95
Val Ala Asp Thr Leu Leu Val Leu Thr Leu Pro Leu Trp Ala Val Asp
100 105 110
Ala Ala Val Gln Trp Val Phe Gly Ser Gly Leu Cys Lys Val Ala Gly
115 120 125
Ala Leu Phe Asn Ile Asn Phe Tyr Ala Gly Ala Leu Leu Leu Ala Cys
130 135 140
Ile Ser Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Ile Val His Ala Thr Gln Leu Tyr
145 150 155 160
Arg Arg Gly Pro Pro Ala Arg Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Val Trp
165 170 175
Gly Leu Cys Leu Leu Phe Ala Leu Pro Asp Phe Ile Phe Leu Ser Ala
180 185 190
His His Asp Glu Arg Leu Asn Ala Thr His Cys Gln Tyr Asn Phe Pro
195 200 205
Gln Val Gly Arg Thr Ala Leu Arg Val Leu Gln Leu Val Ala Gly Phe
210 215 220

Leu Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Tyr Cys Tyr Ala His Ile Leu Ala
 225 230 235 240
 Val Leu Leu Val Ser Arg Gly Gln Arg Arg Leu Arg Ala Met Arg Leu
 245 250 255
 Val Val Val Val Val Val Ala Phe Ala Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His
 260 265 270
 Leu Val Val Leu Val Asp Ile Leu Met Asp Leu Gly Ala Leu Ala Arg
 275 280 285
 Asn Cys Gly Arg Glu Ser Arg Val Asp Val Ala Lys Ser Val Thr Ser
 290 295 300
 Gly Leu Gly Tyr Met His Cys Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Ala Phe
 305 310 315 320
 Val Gly Val Lys Phe Arg Glu Arg Met Trp Met Leu Leu Leu Arg Leu
 325 330 335
 Gly Cys Pro Asn Gln Arg Gly Leu Gln Arg Gln Pro Ser Ser Ser Arg
 340 345 350
 Arg Asp Ser Ser Trp Ser Glu Thr Ser Glu Ala Ser Tyr Ser Gly Leu
 355 360 365

<210> 23
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 23
 Met Glu Leu Arg Lys Tyr Gly Pro Gly Arg Leu Ala Gly Thr Val Ile
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Ala Gln Ser Lys Ser Gln Thr Lys Ser Asp Ser Ile Thr
 20 25 30
 Lys Glu Phe Leu Pro Gly Leu Tyr Thr Ala Pro Ser Ser Pro Phe Pro
 35 40 45
 Pro Ser Gln Val Ser Asp His Gln Val Leu Asn Asp Ala Glu Val Ala
 50 55 60
 Ala Leu Leu Glu Asn Phe Ser Ser Ser Tyr Asp Tyr Gly Glu Asn Glu
 65 70 75 80
 Ser Asp Ser Cys Cys Thr Ser Pro Pro Cys Pro Gln Asp Phe Ser Leu
 85 90 95
 Asn Phe Asp Arg Ala Phe Leu Pro Ala Leu Tyr Ser Leu Leu Phe Leu
 100 105 110
 Leu Gly Leu Leu Gly Asn Gly Ala Val Ala Ala Val Leu Leu Ser Arg
 115 120 125
 Arg Thr Ala Leu Ser Ser Thr Asp Thr Phe Leu Leu His Leu Ala Val
 130 135 140
 Ala Asp Thr Leu Leu Val Leu Thr Leu Pro Leu Trp Ala Val Asp Ala
 145 150 155 160
 Ala Val Gln Trp Val Phe Gly Ser Gly Leu Cys Lys Val Ala Gly Ala
 165 170 175
 Leu Phe Asn Ile Asn Phe Tyr Ala Gly Ala Leu Leu Leu Ala Cys Ile
 180 185 190
 Ser Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Ile Val His Ala Thr Gln Leu Tyr Arg
 195 200 205
 Arg Gly Pro Pro Ala Arg Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Val Trp Gly
 210 215 220
 Leu Cys Leu Leu Phe Ala Leu Pro Asp Phe Ile Phe Leu Ser Ala His
 225 230 235 240
 His Asp Glu Arg Leu Asn Ala Thr His Cys Gln Tyr Asn Phe Pro Gln
 245 250 255
 Val Gly Arg Thr Ala Leu Arg Val Leu Gln Leu Val Ala Gly Phe Leu
 260 265 270
 Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Tyr Cys Tyr Ala His Ile Leu Ala Val
 275 280 285
 Leu Leu Val Ser Arg Gly Gln Arg Arg Leu Arg Ala Met Arg Leu Val
 290 295 300
 Val Val Val Val Val Ala Phe Ala Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu
 305 310 315 320
 Val Val Leu Val Asp Ile Leu Met Asp Leu Gly Ala Leu Ala Arg Asn
 325 330 335
 Cys Gly Arg Glu Ser Arg Val Asp Val Ala Lys Ser Val Thr Ser Gly
 340 345 350
 Leu Gly Tyr Met His Cys Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Ala Phe Val
 355 360 365
 Gly Val Lys Phe Arg Glu Arg Met Trp Met Leu Leu Leu Arg Leu Gly
 370 375 380
 Cys Pro Asn Gln Arg Gly Leu Gln Arg Gln Pro Ser Ser Ser Arg Arg
 385 390 395 400

[0012]

	Asp Ser Ser Trp Ser Glu Thr Ser Glu Ala Ser Tyr Ser Gly Leu 405 410 415	
	<210> 24	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的CXCL13正向引物	
	<400> 24	
	tggtgcccc aaaactga	18
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的CXCL13反向引物	
	<400> 25	
	tggaacgagg attcacacat	20
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的CXCR5正向引物	
	<400> 26	
	tggtgtccat cacatacaat	20
[0013]	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的CXCR5反向引物	
	<400> 27	
	gggaatctcc gtgtgttac	20
	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的CD19正向引物	
	<400> 28	
	accagtaagg gaatgtgctc	20
	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的CD19反向引物	
	<400> 29	
	gacttgaatg cgtggattt	19
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

[0014]	<223> 合成的CD4正向引物	
	<400> 30	
	ttcgccttcg cagtttgatc	20
	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的CD4反向引物	
	<400> 31	
	caccacaac tccacctcct	20

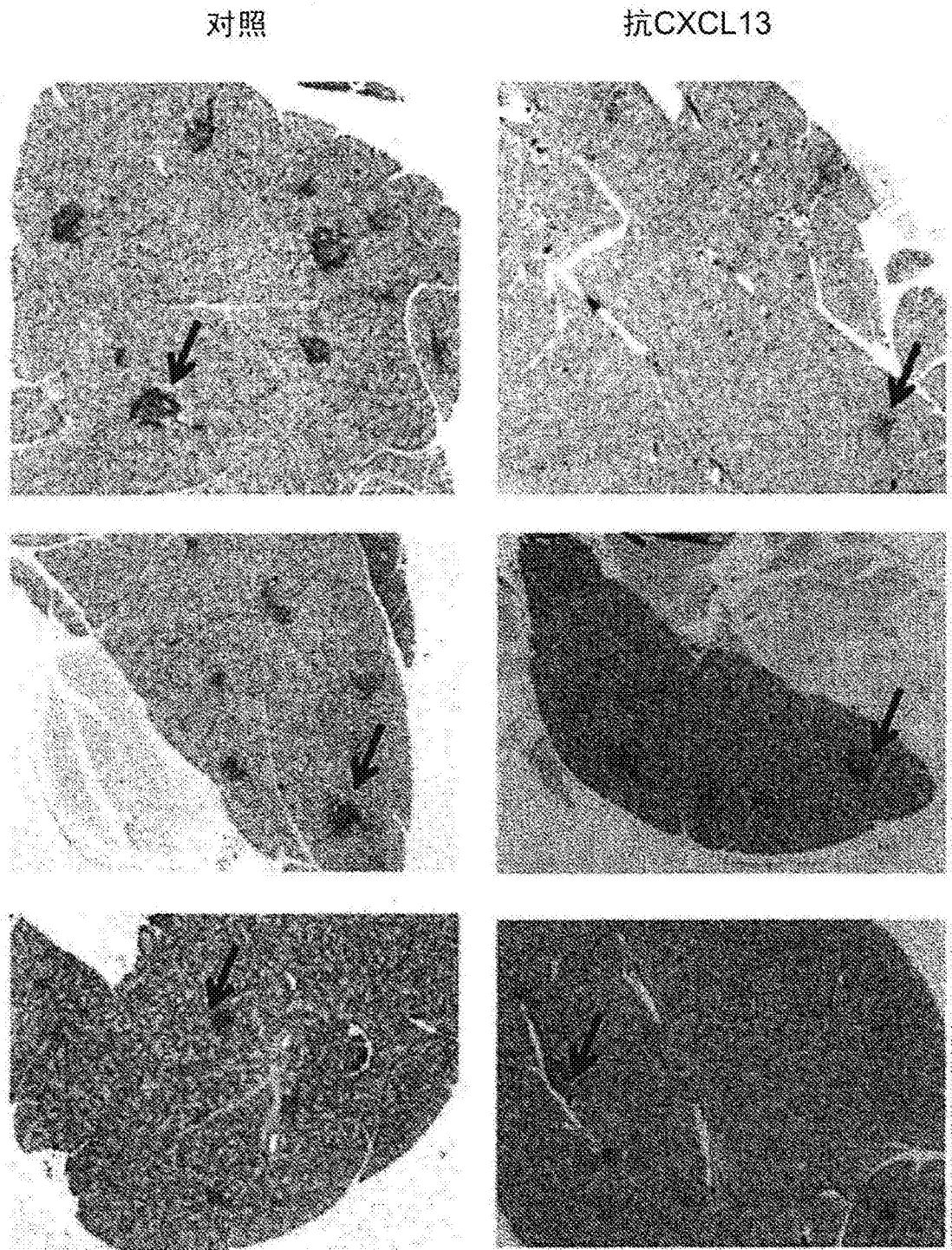


图1A

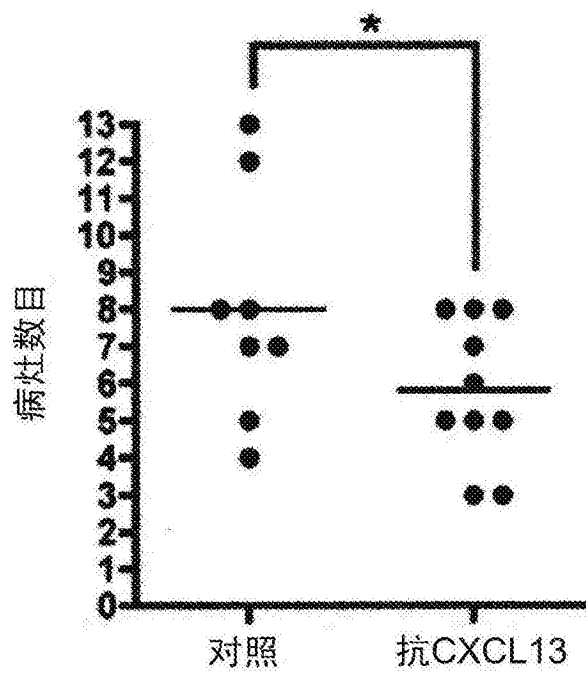


图1B

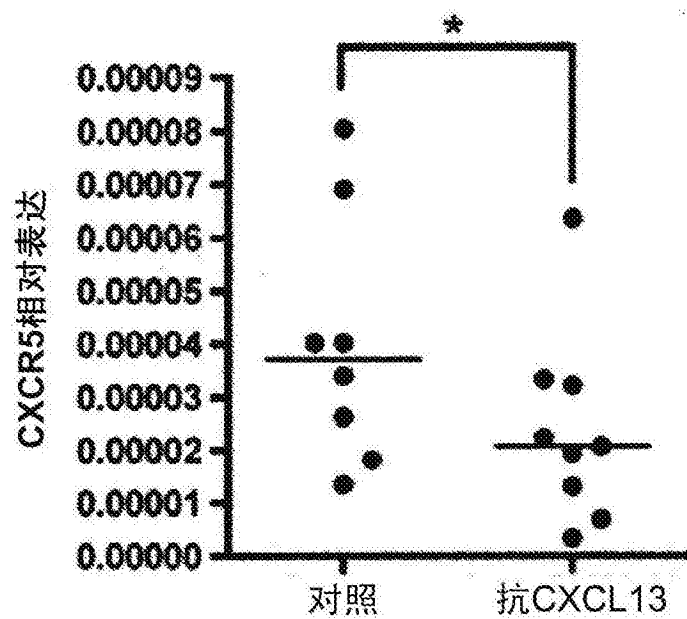


图2

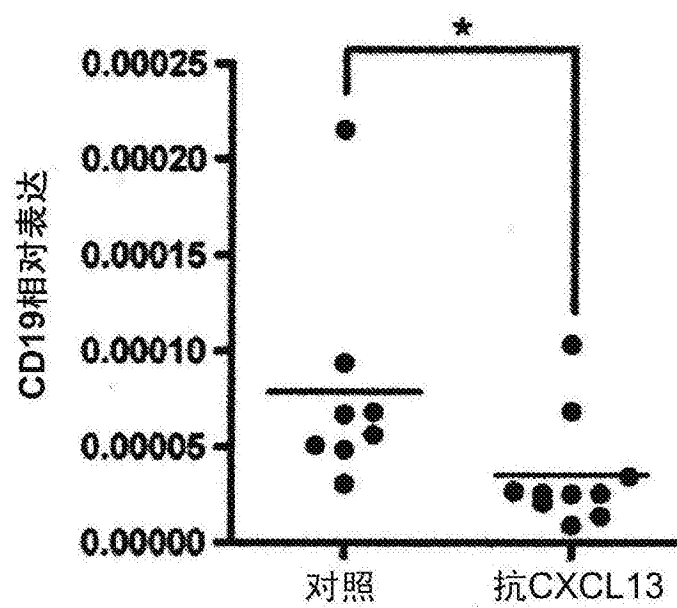


图3

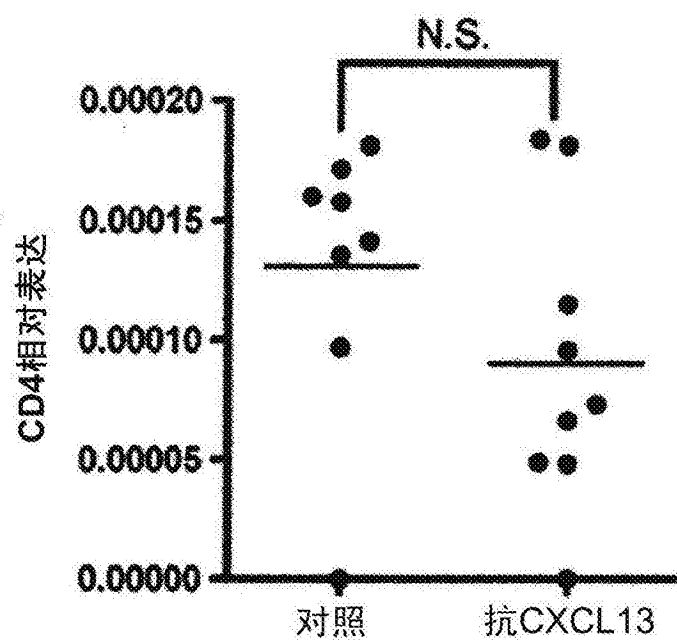


图4