202304984

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202304984 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：111108626 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 03 月 09 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *C07K16/46 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*
A61P35/02 (2006.01)

(30)優先權：2021/03/09 美國 63/158,462
2021/08/05 世界智慧財產權組織 PCT/CN2021/111049

(71)申請人：香港商高誠生物醫藥（香港）有限公司 (香港地區) HIFIBIO (HK) LIMITED (HK)
香港

(72)發明人：施魏策爾 連恩 SCHWEIZER, LIANG (US)；埃爾盧茲 薩米 ELLOUZE, SAMI (FR)；哈魯諾娃 艾林 科克 HARUNOVA, AYRIN KOK (HU)；貝克 史黛芬妮 BEQ, STEPHANIE (FR)；貝爾特拉米內利 尼可拉 阿圖羅 阿爾多 BELTRAMINELLI, NICOLA ARTURO ALDO (CH)；章乾 ZHANG, QIAN (CN)；阿德里安 弗朗西斯科 ADRIAN, FRANCISCO (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：38 項 圖式數：28 共 243 頁

(54)名稱

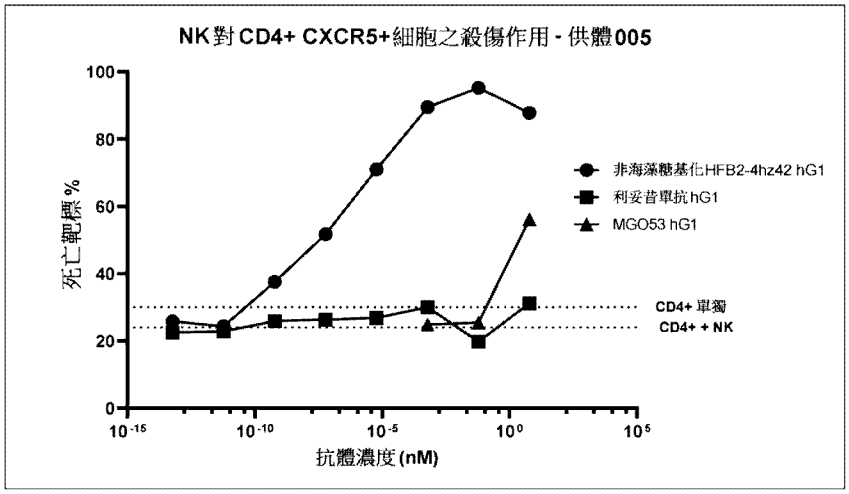
抗人類ＣＸＣＲ５抗體及其用途

(57)摘要

本發明提供對(人類) CXCR5 具特異性之單株抗體及其抗原結合片段，及使用該等單株抗體及其抗原結合片段治療休格蘭症候群(Sjögren syndrome)、某些癌症及自體免疫病症之方法，包括組合療法。

The invention provides monoclonal antibodies and antigen-binding fragments thereof specific for (human) CXCR5, and methods of using the same to treat Sjögren syndrome, certain cancers and autoimmune disorders, including combination therapy.

指定代表圖：


NK對CD4+ CXCR5+細胞之殺傷作用 - 供體005
死亡靶標 %
100
80
60
40
20
0
10-15
10-10
10-5
100
105
抗體濃度 (nM)
非海藻糖基化HFB2-4hz42 hG1
利妥昔單抗 hG1
MGO53 hG1
CD4+ 單獨
CD4+ + NK

【圖 9F】

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗人類CXCR5抗體及其用途

【英文發明名稱】ANTI-HUMAN CXCR5 ANTIBODY AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供對(人類) CXCR5具特異性之單株抗體及其抗原結合片段，及使用該等單株抗體及其抗原結合片段治療休格蘭症候群(Sjögren syndrome)、某些癌症及自體免疫病症之方法，包括組合療法。

【英文】

The invention provides monoclonal antibodies and antigen-binding fragments thereof specific for (human) CXCR5, and methods of using the same to treat Sjögren syndrome, certain cancers and autoimmune disorders, including combination therapy.

【指定代表圖】圖9F

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗人類CXCR5抗體及其用途

【英文發明名稱】ANTI-HUMAN CXCR5 ANTIBODY AND USES THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 C-X-C趨化因子受體類型5 (CXC-R5) (亦稱為CD185 (分化簇185))或伯基特氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma)受體1 (*BLR1*)為趨化因子CXCL13 (亦稱為BLC)之G蛋白偶合七跨膜受體且屬于CXC趨化因子受體家族。在人類中，CXC-R5蛋白由*CXCR5*基因編碼，且其使T細胞能夠遷移至淋巴結B細胞區。

【0002】 *BLR1*/*CXCR5*基因特定而言在伯基特氏淋巴瘤及淋巴組織(諸如淋巴結中以及脾臟中之濾泡)中表現。該基因在B細胞遷移中發揮必要作用。通過CXCL13分泌，B細胞能夠定位淋巴結。另外，一些當前研究表明CXCL13通過CXCR5能夠招募造血前驅細胞($CD3^{-}CD4^{+}$)，此將引起淋巴結及派爾斑(Peyer's Patch)之發育。

【0003】 另一方面，T細胞在沒有CXCR5表現之情況下不能到達B細胞濾泡。此為高親和力抗體製備中之关键步驟，因為B細胞及T細胞需要相互作用以活化Ig類別轉換。

【0004】 因此，已顯示CXCR5將在成熟休眠B細胞、扁桃體B細胞、CD4與CD8 T細胞上表現，不過常常将其视為確定T濾泡輔助(Tfh)細胞之標記物。

【0005】 乳癌患者中之CXCR5過表現與淋巴結轉移高度相關。此外，升高之CXCR5表現可促進缺乏功能性p53蛋白之乳房腫瘤中之異常細胞存活及遷移。SNP rs630923之微小等位基因定位於CXCR5基因啟動子區且與多發性硬化之風險相關，使得出現在活化期間引起B細胞中之CXCR5基因啟動子活性降低之MEF2C結合位點，從而可導致自身免疫反應降低。

【0006】 CXCR5還與前列腺癌之轉移性進展有關，已發現前列腺癌組織以及細胞株表現較高非基礎水準之CXCR5。此外，發現了CXCR5表現水準與格裡森得分(Gleason score)之間的相關性。

【0007】 CXCR5為GC (生髮中心，Forster等人, 1996 -Allen等人2004)之極化/組織所需的。CXCR5及其配位體CXCL13為B/T邊界區之B/T細胞遷移至二級淋巴器官之GC中所需的(Allen等人, 2004-Relf等人, 2012)。B/T區中之B/T細胞相互作用為BCR親和力成熟及B細胞擴增所需的(Breitfield等人, 2000)。

【0008】 大多數趨化因子已知結合至超過一種受體。然而，CXCR5-CXCL13相互作用似乎為獨特的，因為沒有其他配位體結合CXCR5且沒有其他受體結合CXCL13，雖然CXCR3為與CXCR5具有約38.5%胺基酸序列一致性或51.5%相似性之最靠近的旁系同源物。

【0009】 休格蘭症候群(Sjögren syndrome) (SjS、SS)為一種長期自體免疫疾病，其影響身體之水分產生腺體。該疾病以在1933年對其進行描述之Henrik Sjögren命名。SS之主要症狀包括口乾及眼乾。其他症狀可包括皮膚乾燥、陰道乾燥、慢性咳嗽、手臂及腿部麻木、疲勞感、肌肉及關節疼痛及甲狀腺問題。彼等受影響之患者之淋巴瘤風險亦增加(5%)。

【0010】 0.2%-1.2%之人口受到SS之影響，其中一半具有原發形式(其獨立於其他健康問題發生)且一半具有繼發形式(其為另一結締組織病症之結果)。女性受到影響為男性的約十倍，且其通常在中年開始；但任何人均可受影響。在彼等沒有其他自體免疫病症之患者中，預期壽命不變。

【0011】 雖然SS之確切原因尚不清楚，但咸信涉及遺傳學與環境誘因(諸如暴露於病毒或細菌)之組合。產生之炎症逐漸損害腺體。

【0012】 當前對SS之治療係針對症狀。乾眼症治療包括人工眼淚、藥物減輕炎症、封閉淚點或手術關閉淚腺。對於口乾，可使用口香糖(較佳不含糖)、啜

飲清水或唾液取代物。在具有關節或肌肉疼痛的彼等患者中，可使用布洛芬(ibuprofen)。還可停止使用可引起乾燥之藥物，諸如抗組織胺。

【0013】 因此，需要開發治療休格蘭症候群以及其他機械相關疾病或適應症之治療性試劑。

【發明內容】

【0014】 本文所描述之發明提供拮抗性抗hCXCR5抗體，其亦通過抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)選擇性地消耗$CXCR5^+$細胞，此不僅抑制Tfh與B細胞之遷移，而且消除已存在之$CXCR5^+$細胞，因此減少組織損傷及致病性抗體產生。

【0015】 因此，本文所描述之發明提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5 (hCXCR5)具特異性，且其中該單株抗體包含：(1)重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列；其中該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；視情況，該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一單株抗體之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；及/或(2)輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列；其中該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列；視情況，該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一單株抗體之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0016】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 1、2及3之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列

及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 9、10及11之胺基酸序列。

【0017】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 17、18及19之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 25、26及27之胺基酸序列。

【0018】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、34及35之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 41、42及43之胺基酸序列。

【0019】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列。

【0020】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及65之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列。

【0021】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 69、70及71之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 76、77及78之胺基酸序列。

【0022】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 149、150及151之胺基酸序列。

【0023】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 114、115及116之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 120、121及122之胺基酸序列。

【0024】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段為小鼠-人類嵌合抗體，該小鼠-人類嵌合抗體包含人類抗體(諸如hIgG1、hIgG2、

hIgG3或hIgG4)之恆定區序列，其中VH序列為SEQ ID NO: 8、24、40、56、65或75中之任一者或與SEQ ID NO: 8、24、40、56、65或75之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，及/或其中VL序列為SEQ ID NO: 16、32、48、63、68或83中之任一者或與SEQ ID NO: 16、32、48、63、68或83之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0025】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 8或與SEQ ID NO: 8具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 16或與SEQ ID NO: 16具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0026】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 24或與SEQ ID NO: 24具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 32或與SEQ ID NO: 32具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0027】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 40或與SEQ ID NO: 40具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 48或與SEQ ID NO: 48具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0028】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 56或與SEQ ID NO: 56具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 63或與SEQ ID NO: 63具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0029】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 65或與SEQ ID NO: 65具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致

性，且VL序列為SEQ ID NO: 68或與SEQ ID NO: 68具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0030】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 75或與SEQ ID NO: 75具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 83或與SEQ ID NO: 83具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0031】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段為人類化抗體，視情況，其中該人類化抗體包含：(1)表B、表D及表E中之任一單株抗體之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列；及/或表C、表D及表E中之任一單株抗體之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(2) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(3) SEQ ID NO: 113之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(4) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 101之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(5) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 109之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列。

【0032】　在一些實施例中，人類化抗體包含：表B及表D中之任一抗體之VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4。

【0033】　在一些實施例中，VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4序列分別包含(i)與SEQ ID NO: 84、85、86及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(ii)與SEQ ID NO: 89、90、91及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iii)與SEQ ID NO: 93、94、95及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iv)與SEQ ID NO: 132、85、133及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(v)與SEQ ID NO: 93、126、127及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vi)與SEQ ID NO: 132、133、134及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vii)與SEQ ID NO: 138、94、139及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(viii)與SEQ ID NO: 141、142、143及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0034】　在一些實施例中，人類化抗體包含：表C及表D中之任一抗體之VL構架區序列VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4。

【0035】　在一些實施例中，VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4序列分別包含(i)與SEQ ID NO: 97、98、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、

90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(ii)與SEQ ID NO: 97、102、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iii)與SEQ ID NO: 103、104、105及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iv)與SEQ ID NO: 103、107、108及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(v)與SEQ ID NO: 134、135、136及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vi)與SEQ ID NO: 128、129、130及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vii)與SEQ ID NO: 145、146、147及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(viii)與SEQ ID NO: 97、98、152及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或(ix)與SEQ ID NO: 154、102、99及47之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0036】　在一些實施例中，VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4序列分別包含(i) SEQ ID NO: 93、94、95及87，(ii) SEQ ID NO: 132、85、133及87，(iii) SEQ ID NO: 93、126、127及87，或(iv) SEQ ID NO: 132、133、134及87；及/或VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4序列分別包含(i) SEQ ID NO: 134、135、136及131，或(ii) SEQ ID NO: 128、129、130及131。

【0037】　在一些實施例中，VH序列包含SEQ ID NO: 96之胺基酸序列且VL序

列包含SEQ ID NO: 112之胺基酸序列，或VH序列包含SEQ ID NO: 113之胺基酸序列且VL序列包含SEQ ID NO: 112之胺基酸序列。

【0038】 在一些實施例中，VH序列包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列且VL序列包含SEQ ID NO: 111之胺基酸序列。

【0039】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有SEQ ID NO: 114-116之VH CDR1-CDR3胺基酸序列的VH序列，及含有SEQ ID NO: 120-122之VL CDR1-CDR3胺基酸序列的VL序列。

【0040】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有SEQ ID NO: 113之胺基酸序列的VH序列及含有SEQ ID NO: 112之胺基酸序列的VL序列。

【0041】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有HFB2-4hz42hG1之VH序列之VH CDR1-CDR3胺基酸序列的VH序列及含有HFB2-4hz42hG1之VL序列之VL CDR1-CDR3胺基酸序列的VL序列。

【0042】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有HFB2-4hz42hG1之VH序列之胺基酸序列的VH序列及含有HFB2-4hz42hG1之VL序列之胺基酸序列的VL序列。

【0043】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段包含經修飾之Fc區以增強ADCC。

【0044】 在某些實施例中，經修飾之Fc區包含：(1)

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L突變以增強FcγRIIIa結合；(2) S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合；(3) S239D/I332E/A330L突變以同時增強FcγRIIIa結合且降低FcγRIIIb結合；(4) S298A/E333A/K334A突變以增強FcγRIIIa結合；及/或(5) Fc區之非海藻糖基化N297以增強FcγRIIIa結合。

【0045】 在某些實施例中，其抗原結合片段為Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【0046】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段的ADCC活性具有低(例如1-5或1-2) pM範圍EC50值。

【0047】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段針對表現表面hCXCR5之原代B細胞及/或表現表面hCXCR5之原代T細胞具有ADCC活性。

【0048】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【0049】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段抑制cAMP信號傳導(例如EC50小於1 nM)。

【0050】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段抑制趨化性(例如在約0.1-0.5 nM或約0.1 nM下具有約100%抑制)。

【0051】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段抑制hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【0052】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段實質上不與hCXCR3交叉反應。

【0053】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段結合

至黏附細胞株(諸如DX002)及/或懸浮細胞株(諸如M300-19)上所表現之hCXCR5。

【0054】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段不與或最低限度地與hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物交叉反應。

【0055】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段降低個體中記憶B細胞群體之百分比。

【0056】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段以小於約25 nM、20 nM、15 nM、10 nM、5 nM、2 nM或1 nM或更小之K_d結合hCXCR5。

【0057】 本發明之另一態樣提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其與任一前述實施例之分離之單株抗體或其抗原結合片段競爭結合至相同抗原決定基。

【0058】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之休格蘭症候群(SS)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0059】 在某些實施例中，該方法緩解SS之至少一種症狀。

【0060】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之淋巴瘤或白血病的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0061】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為B細胞淋巴瘤。

【0062】 在某些實施例中，B細胞淋巴瘤為CLL (B細胞慢性淋巴細胞性白血病)。

【0063】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)，諸如伯基特氏淋巴瘤。

【0064】　本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之具有異位生髮中心之疾病或適應症(包括自體免疫疾病或病症)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0065】　在某些實施例中，疾病或適應症為類風濕性關節炎(RA)、系統性紅斑狼瘡(SLE)、乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、I型糖尿病、多發性硬化(MS)、類肉瘤病、銀屑病、重症肌無力、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyrioiditis)、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、動脈硬化、結膜炎、胃炎、肝炎或皮炎。

【0066】　本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之實體癌症的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)，其中實體癌症視情況為胃癌、乳癌、腸癌、肺癌或前列腺癌。

【0067】　在某些實施例中，治療淋巴瘤或白血病之方法及/或治療實體癌症之方法進一步包括向患者投與化學治療劑、抗血管生成劑、生長抑制劑、免疫腫瘤劑及/或抗贅生組合物。

【0068】　本發明之另一態樣提供編碼本發明之重鏈或輕鏈或其抗原結合部分之聚核苷酸。

【0069】　在某些實施例中，聚核苷酸經密碼子優化以在人類細胞中表現。

【0070】　本發明之另一態樣提供一種包含本發明之聚核苷酸的載體。

【0071】　在某些實施例中，載體為表現載體(例如哺乳動物表現載體、酵母表現載體、昆蟲表現載體或細菌表現載體)。

【0072】　應瞭解，除非明確否認或除非不適當，否則本發明之任一實施例(包括僅在實例或申請專利範圍中描述之實施例)可與本發明之任何一或多個其他實施例組合。

【圖式簡單說明】

【0073】

圖1顯示人類CXCR5與其最靠近之旁系同源物CXCR3之序列比對，其具有低38.5%序列一致性及51.5%序列相似性。

圖2A及2B顯示各種經鑑定之小鼠抗CXCR5單株抗體之VH (圖2A)及VL (圖2B)區的IMGT序列比對。將VH及VL序列之CDR1-CDR3突出顯示。所有抗體獲自不同VDJ重組事件(不同家族)。雖然HFB2-3與VH4及VH5具有類似VH序列，但CDR3更不同，因此賦予獨特特性。HFB2-4及HFB2-5在CDR3區序列中之不同之處為1個胺基酸(a.a)。

圖3顯示野生型小鼠中嵌合抗CXCR5小鼠單株抗體HFB2-4hG1之藥物動力學(PK)型態。

圖4A及4B分別顯示基於小鼠單株抗體HFB2-4之3個人類化VH區及4個人類化VL區之IMGT序列比對。

圖5顯示本發明之若干嵌合單株抗體對黏附細胞株上所表現之hCXCR5抗原之亞nM EC50結合能力。

圖6A表明基於抗體交叉反應性評估，本發明之嵌合抗體與瞬時轉染細胞上所表現之食蟹猴及鼠CXCR5基本上沒有交叉反應性。

圖6B表明本發明之嵌合抗體不結合至hCXCR5-hCXCR3之最靠近之異種同源物。

圖7表明本發明之抗CXCR5抗體高效抑制配位體(CXCL13)誘導之B細胞遷移。

圖8顯示某些抗CXCR5單株抗體對細胞內cAMP信號傳導之效應。資料表明嵌合抗體中之兩者在配位體(CXCL13)活化後高效阻斷cAMP信號傳導。

圖9A顯示對本發明之六種嵌合單株抗體之ADCC報告子生物分析之結果。資料表明本發明抗CXCR5單株抗體可通過接合CD16觸發ADCC，其中HFB2-4展示最有效之CD16接合。

圖9B顯示使用HFB2-4hG1及HFB2-4hG1DE抗體之ADCC報告子生物分析。分析中亦包括抗CD20 IgG1 (陽性對照)及同型匹配之陰性對照IgG1抗體。圖下之表格中提供代表性EC50值(不一定與圖中之值匹配)。

圖9C顯示與陽性對照利妥昔單抗(Rituximab)及同型對照(MGO53-hG1DE)相比HFB2-4hG1DE介導之原代NK細胞對Raji細胞之ADCC溶解。

圖9D顯示與陽性對照利妥昔單抗及同型對照(MGO53-hG1DE)相比HFB2-4hG1DE介導之原代NK細胞對原代B細胞之ADCC溶解。

圖9E顯示與同型對照(MGO53-hG1DE)及沒有抗體($CD4^+$細胞+ NK)相比由HFB2-4hG1DE誘導之原代NK細胞對原代T細胞之ADCC介導之溶解。亦參見圖9F。

圖9F顯示在5:1之E:T比率下與利妥昔單抗(hG1)、同型對照(MGO53-hG1)及沒有抗體($CD4^+$細胞+ NK)相比由非海藻糖基化抗體AfuHFB2-4hG1誘導之原代NK細胞對原代T細胞之ADCC介導之溶解。利妥昔單抗靶向所有B細胞之表面所表現之CD20，且因此利妥昔單抗預期不靶向不表現CD20之T細胞。

圖9G及9H顯示在3:1之E:T比率下使用HFB2-4hG1DE、呈hG1模式之利妥昔單抗(陽性對照)及DE同型對照使用來自原發性休格蘭症候群(SS)患者(圖9G)及淋巴增生性pSS患者(圖9H)之B細胞作為靶細胞之ADCC報告子分析之結果。頂部圖：ADCC報告子分析之發光讀數(RLU)。底部圖：誘導倍數，計算為RLU (具有抗體-背景)/RLU (單獨細胞-背景)。在底部圖中，左側柱：HFB2-4hG1DE，中間柱：陽性對照，右側柱：同型對照。

圖10A及10B顯示藉由兩種不同方案進行之抗體內化的量測。結果表明與陽性對照(CD71)抗體相比，HFB2-4hz9-hG1DE與HFB2-4hz12-hG1DE (兩者均為基於HFB2-4嵌合抗體之人類化抗體)均不內化。

圖11A及11B顯示使用所選人類化變異體抗體之ADCC報告子生物分析之結果。

圖12顯示由所選人類化變異體引起之趨化性抑制。

圖13顯示使用原代B細胞之ADCC報告子生物分析。

圖14顯示靶向結合至不同癌細胞株。

圖15顯示對B細胞淋巴瘤細胞株之ADCC報告子分析。

圖16顯示HFB2-4-hG1之抗腫瘤活體內功效研究之結果。與對照(PBS或同型匹配之MGO53-hG1抗體)相比，HFB2-4hG1與陽性對照均為統計顯著性的(p<0.00001****)。

圖17顯示本發明抗體對休格蘭患者之B細胞之ADCC活性。

圖18顯示pSS患者之樣品中記憶B細胞群體之百分比因本發明抗體而降低。

圖19A及19B顯示HFB2-4hG1之其他人類化變異體(HFB2-4hz-hG1)與Raji細胞之結合。箭頭指示具有最名靠前的結合型態之人類化變異體。

圖20顯示排名最靠前的九種人類化HFB2-4hz-hG1變異體之藥物動力學型態。

圖21顯示排名最靠前的6種HFB2-4hz-hG1變異體與CXCR5+ Raji細胞之結合(左側圖)及報告子系統中用於接合CD16之ADCC活性。

圖22顯示呈hG1DE模式之HFB2-4hz變異體與表現CXCR5之黏附DX002細胞之結合。

圖23顯示呈親本hG1模式(左側圖)及hG1DE模式(右側圖)之排名最靠前的四種人類化HFB2-4hz之藥物動力學型態。

圖24A顯示非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)、非海藻糖基化親本HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)、非海藻糖基化基準hG1抗體及同型對照(MGO53-hG1)與表現CXCR5之DX002細胞之結合。

圖24B顯示afu-HFB2-4hz42-hG1、afu-HFB2-4hG1、非海藻糖基化基準hG1抗體及同型對照(MGO53-hG1)之藉由ADCC報告子分析確定之CD16接合。

圖25顯示與基準及同型對照(MGO53-hG1)抗體相比，由非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)介導之原代NK細胞對來自健康供體之原代B細

胞之ADCC介導之溶解。

圖26顯示與基準及同型對照(MGO53-hG1)抗體相比，由非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)介導之原代NK細胞對來自SS患者之B細胞之ADCC介導之溶解。

圖27A及27B顯示非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)、非海藻糖基化親本HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)、呈hG1模式之利妥昔單抗(陽性對照)及同型對照MGO53-hG1之針對補體依賴性細胞毒性(CDC)活性之測試的結果。使用血清來提供補體系統。在圖27B中，測試兩種不同血清。

圖28A顯示野生型小鼠中非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)、非海藻糖基化親本HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)及基準抗體之藥物動力學型態(n=1)。

圖28B顯示1雄性及2雌性食蟹猴中非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)之藥物動力學型態。

【實施方式】

相關申請案之參考

【0074】 本申請案主張於2021年3月9日申請之美國臨時專利申請案第63/158,462號及於2021年8月5日申請之國際專利申請案第PCT/CN2021/111049號之優先權，以上參考申請案中之每一者的全部內容，包括任何圖式及序列表，以引用之方式併入本文中。

1. 綜述

【0075】 根據本文所描述之發明，使用多種免疫策略將小鼠用重組人類CXCR5免疫。與申請人所有之基於單細胞之抗體篩選技術組合，自三次獨立篩選鑑定了六種高親和力抗CXCR5小鼠單株抗體HFB2-1至HBF2-6。

【0076】 針對所需功能特徵對此等抗體進行進一步測試，包括特異性(例如

與hCXCR3幾乎沒有交叉反應性)、對細胞株(例如黏附細胞株，諸如DX002；及懸浮細胞株，諸如M300-19)上所表現之CXCR5之結合親和力、交叉反應性(例如hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物)、對B細胞遷移(趨化性)之影響、對細胞內cAMP水準之影響、ADCC報告子分析、使用表現CXCR5之穩定細胞株的內化分析及在小鼠中之PK型態等。

【0077】 舉例而言，FACS (流式細胞術)分析表明除一種外全部先導候選抗體針對表現hCXCR5之CHO細胞顯示亞nM EC50值，且先導抗體(lead antibody)中無一者與食蟹猴或小鼠CXCR5異種同源物交叉反應。此外，先導抗體中無一者結合至hCXCR3旁系同源物，證實其特異性。先導抗體亦高效阻斷hCXCL13誘導之B細胞遷移，且HFB2-4嵌合抗體抑制趨化性為最高效的。HFB2-4及HFB2-5高效阻斷hCXCL13誘導之cAMP信號傳導，且優於基準抗體。ADCC報告子分析(Promega)表明抗hCXCR5 mAb (尤其HFB2-4)接合CD16。

【0078】 基於此等測試，在6種單位數蓁莫耳親和力抗體中，選擇HFB2-4作為在功能分析中具有最高效能及最大效應者，且針對其在野生型小鼠中之PK型態進一步分析。結果表明HFB2-4在小鼠中展現有利PK型態。

【0079】 在腫瘤之小鼠Raji模型中測試HFB2-4之抗腫瘤功效之初步結果亦顯示等同於作為陽性對照之利妥昔單抗的有前景之抗腫瘤效應。

【0080】 基於HFB2-4之總優良生物型態，將其選為用於進一步測試且用於人類化之先導抗體。

【0081】 已藉由將3個VH及4個VL區CDR序列組合(VH1與VL1-VL4中之每一者，VH2與VL1-VL4中之每一者，且VH3與VL1-VL4中之每一者)產生了至少12種人類化變異體(全部具有S239D/I332E突變)，且進行表徵；且進一步合成了另外13種變異體。值得注意的是，根據IMGT系統，所有人類化(Hz)變異體均具有人類生殖系序列之第一匹配。此等人類化變異體大部分保留其物理化學活性(對

靶標之親和力、穩定性、溶解度等)及/或生物活性(阻斷或刺激靶標、ADCC等)。

【0082】 針對所需功能特徵對此等人類化變異體抗體進行進一步測試，包括特異性(例如與hCXCR3幾乎沒有交叉反應性)、對細胞株(例如黏附細胞株，諸如DX002；及懸浮細胞株，諸如M300-19)上所表現之CXCR5之結合親和力、交叉反應性(例如hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物)、對B細胞遷移(趨化性)之影響、對細胞內cAMP水準之影響、使用表現CXCR5之穩定細胞株之內化分析、抗體可開發性評估(諸如SEC及SDS-PAGE分析)、ADCC報告子分析及在小鼠中之PK型態等。

【0083】 結果表明12種HFB2-4hz變異體中10種顯示與親本抗體HFB2-4類似之與hCXCR5之結合；12種HFB2-4hz變異體中9種阻斷cAMP信號傳導；Hz變異體有效抑制趨化性，其中HFB2-4hz12為最有效的(在0.1 nM下約100%)，且HFB2-4hz9中效應類似；且有效阻斷hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【0084】 基於HFB2-4hz12之總優良生物型態，將其選為用於ADCC測試之先導候選物。結果表明HFB2-4hz12hG1DE以及HFB2-4hz9hG1DE具有達至低pM範圍(1-2 pM) EC50之有效ADCC活性。資料進一步表明人類化過程不改變候選抗體(例如HFB2-4DE抗體)之高ADCC效能。另外，HFB2-4hz12hG1DE對表現hCXCR5之原代B細胞顯示ADCC活性。

【0085】 內化研究表明HFB2-4hz12-hG1DE及HFB2-4hz9-hG1DE Hz變異體不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【0086】 PK型態表明與親本抗體HFB2-4hG1 (109 h)相比，HFB2-4hz12-hG1DE在血漿中具有更短之半衰期(4.5h)。

【0087】 亦針對許多可開發性分析對包括HFB2-4hz2hG1、HFB2-4hz9hG1DE、HFB2-4hz10hG1DE、HFB2-4hz11hG1DE及HFB2-4hz12hG1DE之

所選Hz抗體進行測試，該等可開發性分析包括在25及40℃下持續長達14天之加速穩定性研究；在25℃下在100 mM乙酸鹽(pH 3.5)中長達6小時之強制降解研究；及在PBS (pH 7.4)中多至三個冷凍/解凍循環(全部為2 mg/mL抗體濃度)。結果表明根據SDS-PAGE凝膠，HFB2-4hz12hG1DE具有最穩定之型態。總體來說，HFB2-4hz9hG1DE及HFB2-4hz12hG1DE在所測試抗體中顯示最有利之型態，且選擇用於產生基於該等抗體之其他Hz變異體。

【0088】　產生且選擇許多其他第二輪人類化抗體。此類第二輪人類化(Hz)變異體列於下表中。所測試之所有此類人類化變異體均以亞nM EC50值結合hCXCR5。所有此類Hz變異體均以亞nM EC50結合hCXCR5。在親本抗體及人類化變異體抗體中發現類似之結合特性，包括對hCXCR5之結合親和力，及接合CD16以誘導ADCC。

表1. 所選第二輪人類化變異體

Ab變異體	V-基因名稱 (VH)	人類化% (VH)	V-基因名稱(VL)	人類化%(VL)	實驗1 EC50 (nM)	實驗2 EC50 (nM)
HFB2-4hG1DE	嵌合親本				1	1.3
HFB2-4hz9-hG1DE	VH3	87.4	VL1	91.4	1.3	1
HFB2-4hz14-hG1DE	VH3	87.4	VL1b	96.8	0.4	0.1
HFB2-4hz15-hG1DE	VH3	87.4	VL1c	88.2	0.6	0.05
HFB2-4hz18-hG1DE	VH3c	83.2	VL1	91.4	0.6	0.1
HFB2-4hz19-hG1DE	VH3d	86.3	VL1	91.4	0.5	0.2
HFB2-4hz12-hG1DE	VH3	87.4	VL4	83.9	1.2	0.3
HFB2-4hz24-hG1DE	VH3	87.4	VL4c	79.6	0.5	0.2
HFB2-4hz27-hG1DE	VH3c	83.2	VL4	83.9	0.3	0.8
HFB2-4hz28-hG1DE	VH3d	86.3	VL4	83.9	0.7	1.8
HFB2-4hz31-hG1DE	VH3c	83.2	VL1b	96.8	0.4	0.4
HFB2-4hz32-hG1DE	VH3c	83.2	VL1c	88.2	0.5	0.5
HFB2-4hz33-hG1DE	VH3d	86.3	VL1b	96.8	0.3	0.3
HFB2-4hz34-hG1DE	VH3d	86.3	VL1c	88.2	0.6	0.5
HFB2-4hz35-hG1DE	VH3c	83.2	VL4c	79.6	0.7	0.6
HFB2-4hz36-hG1DE	VH3d	86.3	VL4c	79.6	0.5	0.4

【0089】 在此等二級Hz變異體中，選擇HFB2-4hz14-hG1DE及HFB2-4hz15-hG1DE用於進一步可開發性評估(參見上文所描述之分析)。結果表明當在20 mM乙酸鹽(pH 6.0)中調配時，Hz14及Hz15 DE變異體在25及40°C下未顯示不穩定性。此外，在冷凍/解凍循環及低pH值應力處理(pH3.5達6小時)之後穩定性通常保留。總體來說，HFB2-4之人類化變異體(包括HFB2-4hz9-hG1DE、HFB2-4hz12-hG1DE、HFB2-4hz14-hG1DE及HFB2-4hz15-hG1DE)全部展現有利之可開發性型態。選擇此等先導候選物中之一者(HFB2-4hz12-hG1DE)用於進一步開發。

【0090】 基於HFB2-4hG1 (HFB2-4hz-hG1)產生其他基於HFB2-4之人類化變異體，包括HFB2-4hz37-hG1及HFB2-4hz42-hG1。參見實例5及尤其表4。

【0091】 因此，本文所描述之發明提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5 (hCXCR5)具特異性，且其中該單株抗體包含：(1)重鏈可變區(HCVR)，該重鏈可變區包含分別為圖2A之單株抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之任一HCVR CDR1、CDR2及CDR3序列之HCVR CDR1序列、HCVR CDR2序列及HCVR CDR3序列；及(2)輕鏈可變區(LCVR)，該輕鏈可變區包含分別為圖2B中之單株抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之任一LCVR CDR1、CDR2及CDR3序列之LCVR CDR1序列、LCVR CDR2序列及LCVR CDR3序列。

【0092】 在某些實施例中，本發明之抗體包含(1)圖2A中之HFB2-4之HCVR CDR1序列、HCVR CDR2序列及HCVR CDR3序列；及(2)圖2B中之HFB2-4之(對應) LCVR CDR1序列、LCVR CDR2序列及LCVR CDR3序列。

【0093】 在某些實施例中，本發明之抗體為小鼠-人類嵌合抗體，該小鼠-人類嵌合抗體包含人類抗體(諸如hIgG1或hIgG2)之恆定區序列，及圖2A中之單株

抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之任一HCVR序列之HCVR；及圖2B中之單株抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之(對應)任一LCVR序列之LCVR。

【0094】 在某些實施例中，小鼠-人類嵌合抗體包含圖2A中之HFB2-4之HCVR序列，及圖2B中之HFB2-4之LCVR序列。

【0095】 在某些實施例中，本發明之抗體為人類化抗體。

【0096】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之單株抗體之HCVR CDR1序列、HCVR CDR2序列及HCVR CDR3序列；及(2)圖4B中之單株抗體之LCVR CDR1序列、LCVR CDR2序列及LCVR CDR3序列。

【0097】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之VH1、VH2及VH3序列之任一HCVR序列的構架區序列，及/或(2)圖4B中之VL1、VL2、VL3及VL4序列之任一LCVR序列的構架區序列。

【0098】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之VH3之構架區序列，及/或(2)圖4B中之VL1之構架區序列。

【0099】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之VH3之構架區序列，及/或(2)圖4B中之VL4之構架區序列。

【0100】 在某些實施例中，本發明之抗體具有經修飾之Fc區以增強ADCC。舉例而言，在某些實施例中，本發明之抗體包含F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L突變以增強FcγRIIIa結合。在某些實施例中，本發明之抗體包含S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合(本文中之hIgG1-DE)。在某些實施例中，本發明之抗體包含S239D/I332E/A330L突變以同時增強FcγRIIIa結合且降低FcγRIIIb結合。在某些實施例中，本發明之抗體包含S298A/E333A/K334A突變以增強FcγRIIIa結合。

【0101】 在某些實施例中，本發明之抗體為人類化小鼠單株抗體，視情況，

抗體包含S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合(hIgG1-DE)。舉例而言，人類化單株抗體可藉由使小鼠單株抗體之CDR區CDR接枝至人類構架區中來產生。

【0102】 在某些實施例中，本發明之抗體的ADCC活性具有低(例如1-5或1-2) pM範圍EC50值。

【0103】 在某些實施例中，本發明之抗體針對表現表面hCXCR5之原代B細胞具有ADCC活性。

【0104】 在某些實施例中，本發明之抗體不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【0105】 在某些實施例中，本發明之抗體抑制cAMP信號傳導。

【0106】 在某些實施例中，本發明之抗體抑制趨化性(例如在約0.1-0.5 nM或約0.1 nM下具有約100%抑制)。

【0107】 在某些實施例中，本發明之抗體抑制hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【0108】 在某些實施例中，本發明之抗體對hCXCR5具特異性(例如與hCXCR3沒有或幾乎沒有交叉反應性。

【0109】 在某些實施例中，本發明之抗體結合至黏附細胞株(諸如DX002)及/或懸浮細胞株(諸如M300-19)上所表現之hCXCR5。

【0110】 在某些實施例中，本發明之抗體不與或最低限度地與hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物交叉反應。

【0111】 在某些實施例中，本發明之抗體降低個體中記憶B細胞群體之百分比。

【0112】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之休格蘭症候群(SS)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0113】 約25%之休格蘭症候群患者顯示異位生髮中心(GC)在唾液腺中具有

高CXCR5$^+$細胞浸潤，SS患者中之GC富含於產生CXCL13之Tfh細胞中，其將CXCR5$^+$ B細胞招募且分化至產生抗體之細胞中。已在小鼠SS模型中及人類疾病中發現CXCL13水準升高。此外，在休格蘭氏病之動物模型中已發現CXCL13之中和具保護性。

【0114】 在某些實施例中，該方法緩解SS之至少一種症狀。

【0115】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之淋巴瘤或白血病的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0116】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為B細胞淋巴瘤。

【0117】 在某些實施例中，B細胞淋巴瘤為CLL (B細胞慢性淋巴細胞性白血病)。

【0118】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為非霍奇金氏淋巴瘤，諸如伯基特氏淋巴瘤。

【0119】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之具有異位生髮中心之疾病或適應症(包括自體免疫疾病或病症)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0120】 在某些實施例中，疾病或適應症為類風濕性關節炎(RA)、系統性紅斑狼瘡(SLE)、乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn’s disease)、潰瘍性結腸炎、I型糖尿病、多發性硬化(MS)、類肉瘤病、銀屑病、重症肌無力、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto’s thyrioiditis)、格雷夫斯氏病(Grave’s disease)、動脈硬化、結膜炎、胃炎、肝炎或皮炎。

【0121】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之實體癌症的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0122】 在某些實施例中，實體癌症為胃癌、乳癌、腸癌、肺癌或前列腺癌。

【0123】 以下各個部分中進一步且單獨地描述本發明之詳細態樣。然而，應瞭解，本發明之任一實施例(包括僅描述於實例或圖式中之實施例及僅描述於以下一個部分中之實施例)可與本發明之任何其他實施例組合。

2. 定義

【0124】 術語「抗體」廣義上涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體及多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。術語「抗體」亦可泛指包含重鏈之互補決定區(CDR) 1、CDR2及CDR3及輕鏈之CDR1、CDR2及CDR3的分子，其中該分子能夠結合至抗原。術語「抗體」亦包括但不限於嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體及各種物種(諸如小鼠、人類、食蟹猴等)之抗體。

【0125】 然而，在狹義上，「抗體」係指各種單株抗體，包括嵌合單株抗體、人類化單株抗體及人類單株抗體，尤其本發明之人類化單株抗體。

【0126】 在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區(HCVR)及輕鏈可變區(LCVR)。在一些實施例中，抗體包含至少一條重鏈(HC)，該至少一條重鏈包含重鏈可變區及至少一部分重鏈恆定區；及至少一條輕鏈(LC)，該至少一條輕鏈包含輕鏈可變區及至少一部分輕鏈恆定區。在一些實施例中，抗體包含兩條重鏈，其中各重鏈包含重鏈可變區及至少一部分重鏈恆定區；及兩條輕鏈，其中各輕鏈包含輕鏈可變區及至少一部分輕鏈恆定區。

【0127】 如本文所用，單鏈Fv (scFv)或包含例如包含所有六個CDR (三個重鏈CDR和三個輕鏈CDR)之單一多肽鏈的任何其他抗體均視為具有重鏈及輕鏈。在一些此類實施例中，重鏈為抗體中包含三個重鏈CDR之區域且輕鏈為抗體中包含三個輕鏈CDR之區域。

【0128】 如本文所用之術語「重鏈可變區(HCVR)」至少係指包含重鏈CDR1

(CDR-H1)、構架2 (HFR2)、CDR2 (CDR-H2)、FR3 (HFR3)及CDR3 (CDR-H3)之區域。在一些實施例中，重鏈可變區亦包含至少一部分(例如整個)之FR1 (HFR1)，其為CDR-H1之N端；及/或至少一部分(例如整個)之FR4 (HFR4)，其為CDR-H3之C端。

【0129】 如本文所用之術語「重鏈恆定區」係指包含至少三個重鏈恆定域CH1、CH2及CH3之區域。非限制性示例性重鏈恆定區包括γ、δ及α。非限制性示例性重鏈恆定區亦包括ε及μ。各重恆定區對應於抗體同型。舉例而言，包含γ恆定區之抗體為IgG抗體，包含δ恆定區之抗體為IgD抗體，包含α恆定區之抗體為IgA抗體，包含ε恆定區之抗體為IgE抗體，且包含μ恆定區之抗體為IgM抗體。

【0130】 某些同型可進一步再分成亞類。舉例而言，IgG抗體包括但不限於IgGl (包含γ1恆定區)、IgG2 (包含γ2恆定區)、IgG3 (包含γ3恆定區)及IgG4 (包含γ4恆定區)抗體；IgA抗體包括但不限於IgA1 (包含α1恆定區)及IgA2 (包含α2恆定區)抗體；且IgM抗體包括但不限於IgM1 (包含μ1恆定區)及IgM2 (包含μ2恆定區)。

【0131】 如本文所用之術語「重鏈」係指具有或不具有前導序列之至少包含重鏈可變區之多肽。在一些實施例中，重鏈包含至少一部分之重鏈恆定區。如本文所用之術語「全長重鏈」係指具有或不具有前導序列且具有或不具有C端離胺酸之包含重鏈可變區及重鏈恆定區之多肽。

【0132】 如本文所用之術語「輕鏈可變區(LCVR)」係指包含輕鏈CDR1 (CDR-L1)、構架(FR)2 (LFR2)、CDR2 (CDR-L2)、FR3 (LFR3)及CDR3 (CDR-L3)之區域。在一些實施例中，輕鏈可變區亦包含至少一部分(例如整個)之FR1 (LFR1)及/或至少一部分(例如整個)之FR4 (LFR4)。

【0133】 如本文所用之術語「輕鏈恆定區」係指包含輕鏈恆定域C_L之區域。

非限制性示例性輕鏈恆定區包括λ及κ。

【0134】 如本文所用之術語「輕鏈」係指具有或不具有前導序列之至少包含輕鏈可變區之多肽。在一些實施例中，輕鏈包含至少一部分之輕鏈恆定區。如本文所用之術語「全長輕鏈」係指具有或不具有前導序列之包含輕鏈可變區及輕鏈恆定區之多肽。

【0135】 術語「抗體片段」或(抗體之)「抗原結合部分」包括但不限於能夠結合抗原之片段，諸如Fv、單鏈Fv (scFv)、Fab、Fab'及$(Fab')_2$。在某些實施例中，抗體片段包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【0136】 術語「Fab」係指分子量為約50,000道耳頓之抗體片段，且具有結合至抗原之活性。其包含藉由二硫鍵連接之重鏈之約一半之N端側及整個輕鏈。Fab可特定而言藉由用蛋白酶木瓜蛋白酶處理免疫球蛋白來獲得。

【0137】 術語「$F(ab')_2$」命名約100,000道耳頓且具有結合至抗原之活性的片段。此片段稍微大於鉸鏈區中經由二硫鍵連接之兩個Fab片段。此等片段藉由用蛋白酶胃蛋白酶處理免疫球蛋白來獲得。Fab片段可藉由鉸鏈區之二硫鍵之裂解自F(ab')2片段獲得。

【0138】 單一Fv鏈「scFv」對應於使用編碼VL及VH域之基因及編碼旨在結合此等結構域之肽的序列合成之VH:VL多肽。根據本發明之scFv包括例如使用基因重組技術維持適當構象之CDR。

【0139】 「scFv」之二聚體對應於藉由肽鍵連接在一起之兩個scFv分子。此Fv鏈常常為包括編碼藉由編碼肽之連接子序列連接之VH及VL之基因的融合基因表現之結果。人類scFv片段可包括較佳藉助於使用基因重組技術維持適當構象之CDR區。

【0140】 「dsFv」片段為藉由二硫鍵穩定之VH-VL異二聚體；其可為二價的(dsFV$_2$)。二價Sc(Fv)$_2$或多價抗體之片段可藉由單價scFv之締合自發形成或藉由用肽結合序列連接scFv片段而產生。

【0141】 Fc片段支持抗體之生物特性，尤其其由免疫性效應子識別或活化補體之能力。其由鉸鏈區外重鏈之恆定片段組成。

【0142】 術語「雙抗體」意指具有兩個抗原固定位點之小抗體片段。此等片段在同一VH-VL多肽鏈中包含連接至可變輕鏈結構域VL之可變重鏈結構域VH。使用太短而不允許同一鏈之兩個結構域相匹配之結合序列，必然地發生與另一鏈之兩個互補結構域相匹配且因此形成兩個抗原固定位點。

【0143】 與參考抗體「結合至相同抗原決定基之抗體」可藉由抗體競爭分析來確定。其係指在競爭分析中將參考抗體與其抗原之結合阻斷50%或更多，且相反地，在競爭分析中參考抗體將抗體與其抗原之結合阻斷50%或更多之抗體。當在競爭相同抗原決定基之抗體的背景下使用時，術語「競爭」意指藉由其中正在測試之抗體阻止或抑制參考抗體與共同抗原之特異性結合之分析來確定抗體之間的競爭。

【0144】 可使用許多類型之競爭性結合分析，例如：固相直接或間接放射免疫分析(RIA)、固相直接或間接酶免疫分析(EIA)、夾心競爭分析(參見例如Stahli等人, 1983, Methods in Enzymology 9:242-253)；固相直接生物素-親和素EIA (參見例如Kirkland等人, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619)；固相直接標記分析；固相直接標記夾心分析(參見例如Harlow及Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press)；使用I^{125}標記之固相直接標記RIA (參見例如Morel等人, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15)；固相直接生物素-親和素EIA (參見例如Cheung等人, 1990, Virology 176:546-552)；及直接標記RIA (Moldenhauer等人, 1990, Scand. J. Immunol.)。

【0145】 典型地，此類分析涉及使用結合至固體表面之經純化之抗原或帶有此等抗原中之任一者的細胞、未經標記之測試抗原結合蛋白及經標記之參考抗體。競爭性抑制藉由確定在存在測試抗體之情況下結合至固體表面或細胞之標記的量來量測。通常測試抗體以過量存在。藉由競爭分析(競爭抗體)鑑定之抗體包括與參考抗體結合至相同抗原決定基之抗體及結合至足夠靠近由參考抗體結合之抗原決定基的相鄰抗原決定基從而發生空間位阻之抗體。在一些實施例中，當競爭抗體以過量存在時，其將抑制參考抗體與共同抗原之特異性結合達至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些情況下，抑制結合達至少80%、85%、90%、95%或97%或更多。

【0146】 術語「抗原」係指能夠由選擇性結合劑(諸如抗體或其免疫功能片段)結合且另外能夠在哺乳動物中用於產生能夠結合至彼抗原之抗體的分子或分子之一部分。抗原可具有一或多個能夠與抗體相互作用之抗原決定基。

【0147】 術語「抗原決定基」為抗原分子中由選擇性結合劑(諸如抗體或其片段)結合之部分。該術語包括能夠特異性結合於抗體之任何決定位。抗原決定基可為連續或非連續的(例如在多肽中，在多肽序列中不彼此鄰接但在分子之背景內由抗原結合蛋白結合的胺基酸殘基)。在一些實施例中，抗原決定基可為模擬物，因為其包含類似於用於產生抗體之抗原決定基的三維結構，而不包含任何或僅包含一些在彼抗原決定基中被發現用於產生抗體之胺基酸殘基。抗原決定基決定位可包括分子之化學活性表面基團，諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且可具有特定三維結構特徵及/或比電荷特徵。

【0148】 在一些實施例中，「抗原決定基」藉由用於確定它之方法來定義。舉例而言，在一些實施例中，若如藉由氫-氘交換(HDX)所確定，抗體與參考抗體結合至抗原之相同區域，則抗體與參考抗體結合至相同抗原決定基。

【0149】 在某些實施例中，若如藉由X-射線晶體照像術所確定，抗體與參考

抗體結合至抗原之相同區域，則抗體與參考抗體結合至相同抗原決定基。

【0150】　如本文所用之「嵌合抗體」係指包含來自第一物種(諸如小鼠、大鼠、食蟹猴等)之至少一個可變區及來自第二物種(諸如人類、食蟹猴、雞等)之至少一個恆定區的抗體。在一些實施例中，嵌合抗體包含至少一個小鼠可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中，嵌合抗體之所有可變區來自第一物種且嵌合抗體之所有恆定區來自第二物種。

【0151】　如本文所用之「人類化抗體」係指其中非人類可變區(諸如小鼠、大鼠、食蟹猴、雞等)之構架區中之至少一個胺基酸已經來自人類可變區之對應胺基酸置換的抗體。在一些實施例中，人類化抗體包含至少一個人類恆定區或其片段。在一些實施例中，人類化抗體片段為Fab、scFv、$(Fab')_2$等。

【0152】　如本文所用之「CDR接枝抗體」係指其中第一(非人類)物種之一或多個互補決定區(CDR)已接枝至第二(人類)物種之構架區(FR)上的人類化抗體。

【0153】　如本文所用之「人類抗體」係指人類中產生之抗體、包含人類免疫球蛋白基因之非人類動物(諸如XENOMOUSE®)中產生之抗體及使用體外方法(諸如噬菌體展示)選擇之抗體，其中抗體譜係基於人類免疫球蛋白序列。

【0154】　具有「增強之ADCC活性」之抗體包括當與對照或親本抗體相比時且當分析中所用之此類抗體與對照/親本抗體之量基本上相同時更有效介導活體外或活體內ADCC之抗體，其中該抗體與對照/親本抗體在至少一種結構態樣中有所不同。在一些實施例中，抗體與對照/親本抗體具有相同胺基酸序列，但抗體為非海藻糖基化的，而親本抗體為海藻糖基化的。ADCC活性可使用任何此項技術認可之方法來測定。在一些實施例中，ADCC活性使用如本文揭示之活體外ADCC分析來測定，但涵蓋用於測定ADCC活性之其他分析或方法，例如在動物模型中等。在一些實施例中，具有增強之ADCC活性的抗體對FcγRIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，具有增強之ADCC活性之抗體對

FcγRIIIA (V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，具有增強之ADCC活性之抗體對FcγRIIIA (F158)具有增強之親和力。

【0155】　具有「改變」之FcR結合親和力或ADCC活性之抗體為與對照/親本抗體相比具有增強或減少之FcR結合活性及/或ADCC活性之抗體，其中該抗體與親本抗體在至少一種結構態樣中有所不同。

【0156】　「展示增加之與FcR之結合」之抗體與親本抗體相比以更佳之親和力結合至少一種FcR。

【0157】　「展示降低之與FcR之結合」之抗體與親本抗體相比以更低之親和力結合至少一種FcR。此類展示降低之與FcR之結合之抗體可幾乎沒有可感知之與FcR之結合，例如與天然序列IgG Fc區相比0-20%之與FcR之結合。

【0158】　「增強之對FcγRIIIA之親和力」係指抗體與對照/親本抗體相比具有更大之對Fcγ RIIIA (在一些情況下，亦稱為CD 16a)之親和力，其中該抗體與親本抗體在至少一種結構態樣中有所不同。在一些實施例中，抗體與對照/親本抗體具有相同胺基酸序列，但抗體為非海藻糖基化的，而對照/親本抗體為海藻糖基化的。可使用任何適合用於確定對FcγRIIIA之親和力之方法。在一些實施例中，藉由本文所描述之方法來確定對FcγRIIIA之親和力。在一些實施例中，對FcγRIIIA具有增強之親和力之抗體具有增強之ADCC活性。在一些實施例中，對FcγRIIIA具有增強之親和力之抗體對FcγRIIIA (V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，對FcγRIIIA具有增強之親和力之抗體對FcγRIIIA (F158)具有增強之親和力。

【0159】　「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指目標細胞在存在補體之情況下溶解。經典補體路徑之活化係因補體系統(Clq)之第一組分結合至與其同源抗原結合之抗體(屬於適當子類)而起始。為了評估補體活化，可進行例如如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202: 163, 1996中所描述之CDC分析。

具有改變之Fc區胺基酸序列及增加或降低之Clq結合能力的抗體描述於例如美國專利第6,194,551 B1號、美國專利第7,923,538號、美國專利第7,994,290號及WO 1999/51642中。

【0160】 「宿主細胞」係指可為或已為載體或分離之聚核苷酸之接受者的細胞。宿主細胞可為原核細胞或真核細胞。示例性真核細胞包括哺乳動物細胞，諸如靈長類或非靈長類動物細胞；真菌細胞，諸如酵母；植物細胞；以及昆蟲細胞。非限制性示例性哺乳動物細胞包括但不限於NSO細胞、PER.C6®細胞(Crucell)以及293及CHO細胞及其衍生物，分別諸如293-6E及DG44細胞。

【0161】 如本文所用之術語「分離」係指分子已與典型地與其一起存在於自然界中之至少一些組分分離或已與典型地與其一起產生之至少一些組分分離。舉例而言，當多肽與產生它之細胞之至少一些組分分離時，將該多肽稱為「分離的」。在多肽於表現之後由細胞分泌之情況下，以物理方式將含有該多肽之上清液與產生它之細胞分離被視為「分離」該多肽。類似地，當聚核苷酸不為典型地在自然界中它在其中被發現之更大聚核苷酸的一部分(諸如在DNA聚核苷酸之情況下為基因組DNA或粒線體DNA)，或與產生它之細胞之至少一些組分分離(例如在RNA聚核苷酸之情況下)時，將該聚核苷酸稱為「分離的」。因此，只要宿主細胞內部之載體中所含之DNA聚核苷酸在自然界中不存在於該載體中，即可將彼聚核苷酸稱為「分離的」。

【0162】 術語「個體」及「患者」在本文中可互換地用於指哺乳動物，諸如人類。在一些實施例中，亦提供治療其他非人類哺乳動物之方法，該等其他非人類哺乳動物包括但不限於囓齒動物、猴、貓、犬、馬、牛、豬、綿羊、公山羊、哺乳動物實驗室動物、哺乳動物農場動物、哺乳動物運動動物及哺乳動物寵物。在一些情況下，「個體」或「患者」係指需要針對疾病或病症進行治療之(人類)個體或患者。

【0163】 如本文所用，術語「樣品」或「患者樣品」係指獲自或來源於含有要例如基於物理、生物化學、化學及/或生理特徵進行表徵及/或鑑定之細胞及/或其他分子實體之相關個體之材料。舉例而言，片語「疾病樣品」及其變化型式係指獲自將預期含有或已知含有所要表徵之細胞及/或分子實體之相關個體的任何樣品。

【0164】 「組織或細胞樣品」意指獲自個體或患者之組織之類似細胞的集合。組織或細胞樣品之來源可為如來自新鮮、冷凍及/或保存之器官或組織樣品或活組織切片或抽出物之實體組織；血液或任何血液組成；人體流體，諸如痰液、腦脊髓液、羊水、腹膜液或間隙液；妊娠或個體發育中任何時間之細胞。組織樣品亦可為原代或經培養之細胞或細胞株。視情況，組織或細胞樣品獲自疾病組織/器官。組織樣品可含有本質上不與組織天然混合之化合物，諸如防腐劑、抗凝劑、緩衝劑、固定劑、營養物、抗生素或類似物。

【0165】 如本文所用，「參考樣品」、「參考細胞」或「參考組織」係指獲自已知或咸信未受使用本發明之方法或組合物鑑定之疾病或疾患折磨之來源的樣品、細胞或組織。在一個實施例中，參考樣品、參考細胞或參考組織獲自使用本發明之組合物或方法鑑定疾病或疾患之相同個體或患者之身體的健康部分。在一個實施例中，參考樣品、參考細胞或參考組織獲自不為使用本發明之組合物或方法鑑定疾病或疾患之個體或患者的至少一個個體之身體的健康部分。在一些實施例中，參考樣品、參考細胞或參考組織先前在發展疾病或疾患之前或在疾病或疾患早期自患者獲得。

【0166】 「病症」或「疾病」為將受益於使用本發明之一或多種Gal-9拮抗劑之治療的任何疾患。此包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易感染所討論之病症的彼等病理學疾患。本文中要治療之病症的非限制性實例包括癌症。

【0167】 術語「癌症」在本文中用於指展現異常高水準之增殖及生長的一群細胞。癌症可為良性的(也稱為良性腫瘤)、惡化前或惡性的。癌細胞可為實體癌症細胞(亦即形成實體腫瘤)或白血病性癌細胞。術語「癌症生長」在本文中用於指包含引起對應之癌症尺寸或程度增加之癌症之細胞的增殖或生長。

【0168】 癌症之實例包括但不限於癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤以及白血病。此類癌症之更特定非限制性實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食管癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸道癌、胰腺癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney cancer/renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、腦癌、子宮內膜癌、睾丸癌、膽管細胞癌、膽囊癌、胃癌、黑素瘤及各種類型之頭頸癌。

【0169】 在某些實施例中，如本文所用之癌症包括血液癌(諸如淋巴瘤或白血病，包括CLL、伯基特氏淋巴瘤)或實體腫瘤(諸如乳癌、肺癌及前列腺癌)。

【0170】 「化學治療劑」為可用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括但不限於烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸鹽，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮雜環丙烷，諸如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥多巴(meturedopa)及烏瑞多巴(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基蜜胺，包括六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基蜜胺；多聚乙醯(尤其布拉它辛(bullatacin)及布拉它辛酮)；喜樹鹼(包括合成類似物拓撲替康(topotecan))；蕾司他汀(bryostatin)；卡利他汀(callystatin)；CC-1065 (包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；克拉特非辛(cryptophycin) (特定而言克拉特非辛1及克拉特非辛8)；多拉司他汀

(dolastatin)；多卡黴素(duocarmycin)（包括合成類似物，KW-2189及CB1-TM1)；伊斯羅賓(eleutherobin)；水鬼蕉鹼；匍枝珊瑚醇；海綿抑素；氮芥，諸如氮芥苯丁酸、萘氮芥、膽磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、二氯甲基二乙胺氧化物鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、膽固醇苯乙酸氮芥、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥；硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimnustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如加利車黴素(calicheamicin)，尤其加利車黴素γll及加利車黴素δll (參見例如Agnew, Chem lntl. Ed. Engl , 33: 183-186 (1994))；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯膦酸鹽；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新制癌菌素髮色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomysin)、放線菌素、安麴黴素(authramycin)、氮雜絲胺酸、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C、卡拉比星(carabicin)、洋紅黴素、嗜癌黴素、色黴素、更生黴素(dactinomycin)、柔紅比星(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin) (包括嗎啉基-多柔比星、氰基嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及去氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素、培洛黴素(peplomycin)、泊非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、三鐵阿黴素、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素、鏈佐星(streptozocin)、殺結核菌素、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如胺甲喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如二甲葉酸、胺甲喋呤、蝶羅呤、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌

吟、硫咪嘌呤、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如環胞苷、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷；雄激素，諸如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸鹽(dromostanolone propionate)、表硫雄醇、美雄酮(mepitiostane)、睾內酯；抗腎上腺物，諸如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸酸；乙醯葡醛內酯；醛磷醯胺醣苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；倍曲布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；多弗醯胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；依洛尼塞(elfomithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；埃博黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎵；羥基脲；香菇多糖；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidanmol)；尼曲吖啶(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；蛋氨氮芥；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；足葉草酸；2-乙肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根黴素；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺；細交鏈孢菌酮酸；三亞胺醌；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、疣孢菌素A、桿孢菌素A及蛇形菌素)；胺基甲酸酯；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；類紫杉醇，例如TAXOL®帕西他賽(paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE®不含克列莫佛(Cremophor)之帕西他賽白蛋白工程化奈米粒子調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)及TAXOTERE®多西他賽(doxetaxel) (Rhone-Poulenc Rorer, Antony,

France)；苯丁酸氮芥；GEMZAR®吉西他濱(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巰基嘌呤；胺甲喋呤；鉑類似物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春花鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；NAVELBINE®長春瑞濱(vinorelbine)；雙羥蒽醌；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙；道諾黴素(daunomycin)；胺基喋呤；截瘤達(xeloda)；依班膦酸鹽(ibandronate)；伊立替康(irinotecan) (Camptosar，CPT-11) (包括伊立替康加5-FU及亞葉酸之治療方案)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃醇，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；考布他汀(combretastatin)；亞葉酸(LV)；奧沙利鉑，包括奧沙利鉑治療方案(FOLFOX)；PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR之抑制劑(例如埃羅替尼(erlotinib) (TARCEVA®)))及減少細胞增殖之VEGF-A及以上中之任一者的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

【0171】　其他非限制性示例性化學治療劑包括起作用以調控或抑制激素對癌症之作用的抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抑制調控腎上腺中之雌激素產生的芳香酶之芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE®甲地孕酮乙酸酯、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美斯坦(formestanie)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏羅唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole)；及抗雄激素，諸如氟他米特(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡米特(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；以及曲沙他濱(troxacitabine) (1,3-二氧雜環戊烷核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，特定而言

抑制異常細胞增殖中所涉及之信號傳導通道中之基因(諸如PKC-α、Ralf及H-Ras)之表現的反義寡核苷酸；核糖酶，諸如VEGF表現抑制劑(例如ANGIOZYME®核糖酶)及HER2表現抑制劑；疫苗，諸如基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；及以上中之任一者的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

【0172】 「抗血管生成劑」或「血管生成抑制劑」係指直接或間接抑制血管生成、血管發生或不希望之血管通透性之小分子量物質、聚核苷酸(包括例如抑制RNA (RNAi或siRNA))、多肽、分離之蛋白質、重組蛋白、抗體或其結合物或融合蛋白。應瞭解，抗血管生成劑包括結合及阻斷血管生成因子或其受體之血管生成活性的彼等藥劑。舉例而言，抗血管生成劑為針對血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如針對VEGF-A (例如貝伐單抗(bevacizumab) (AVASTIN®))或針對VEGF-A受體(例如KDR受體或Flt-1受體)之抗體、抗PDGFR抑制劑(諸如GLEEVEC® (伊馬替尼甲磺酸鹽(Imatinib Mesylate)))、阻斷VEGF受體信號傳導之小分子(例如PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT®/SUl 1248 (舒尼替尼蘋果酸鹽(sunitinib malate))、AMG706或例如國際專利申請案WO 2004/113304中所描述之彼等小分子)。抗血管生成劑亦包括天然血管生成抑制劑，例如血管抑素、內皮抑素等。參見例如Klagsbrun及D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39；Streit及Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179 (例如表3列舉惡性黑素瘤中之抗血管生成療法)；Ferrara及Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12): 1359-1364；Tonini等人(2003) Oncogene 22:6549-6556 (例如表2列舉已知抗血管生成因子)；及Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206 (例如表1列舉臨床試驗中所用之抗血管生成劑)。

【0173】 如本文所用之「生長抑制劑」係指抑制細胞(諸如表現VEGF之細胞)

活體外或活體內生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S階段中之細胞(諸如表現VEGF之細胞)的百分比的藥劑。生長抑制劑之實例包括但不限於阻斷細胞週期進展(在除S階段外之位置)之藥劑，諸如誘導G1抑制及M階段抑制之藥劑。經典M階段阻斷劑包括長春花(長春新鹼及長春花鹼)、紫杉烷及拓撲異構酶II抑制劑，諸如多柔比星、表柔比星、柔紅比星、依託泊苷及博來黴素。抑制G1之彼等劑亦溢出至S階段抑制中，例如DNA烷基化劑，諸如他莫昔芬、潑尼松(prednisone)、達卡巴嗪、二氯甲基二乙胺、順鉑、胺甲喋呤、5-氟尿嘧啶及阿糖胞苷。其他資訊可見於Mendelsohn及Israel編, The Molecular Basis of Cancer, 第1章, 標題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」, Murakami等人(W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)，例如第13頁中。紫杉烷(帕西他賽及多西他賽)為來源於紫杉樹之抗癌藥。來源於歐洲紫杉之多西他賽(TAXOTERE®， Rhone-Poulenc Rorer)為帕西他賽(TAXOL®， Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。帕西他賽及多西他賽促進來自微管蛋白二聚體之微管的組裝且藉由防止解聚來穩定微管，此產生對細胞中之有絲分裂的抑制。

【0174】 術語「抗贅生組合物」係指包含至少一種活性治療劑之適用於治療癌症之組合物。治療劑之實例包括但不限於例如化學治療劑、生長抑制劑、細胞毒性劑、放射療法中所用之藥劑、抗血管生成劑、癌症免疫治療劑(亦稱為免疫腫瘤劑)、凋亡劑、抗微管蛋白劑及用於治療癌症之其他藥劑，諸如抗HER-2抗體、抗CD20抗體、表皮生長因子受體(EGFR)拮抗劑(例如酪胺酸激酶抑制劑)、HER1/EGFR抑制劑(例如埃羅替尼(TARCEVA®)、血小板源性生長因子抑制劑(例如GLEEVEC® (伊馬替尼甲磺酸鹽))、COX-2抑制劑(例如塞來昔布(celecoxib))、干擾素、CTLA4抑制劑(例如抗CTLA抗體伊匹單抗(ipilimumab)(YERVOY®))、PD-1抑制劑(例如抗PDl抗體、BMS-936558)、PDL1抑制劑(例如抗PDLl抗體、MPDL3280A)、PDL2抑制劑(例如抗PDL2抗體)、VISTA抑制劑

(例如抗VISTA抗體)、細胞因子、結合至目標ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4、VISTA或VEGF受體中之一者或多者的拮抗劑(例如中和抗體)、TRAIL/Apo2及其他生物活性及有機化學藥劑等。其組合亦包括於本發明中。

【0175】 「治療」係指治療性治療，例如其中目標為減慢(減輕)靶向之病理性疾患或病症，以及其中目標為抑制疾患或病症復發。「治療」涵蓋因哺乳動物(包括人類)之疾病(本文中亦稱為「病症」或「疾患」)而進行的治療劑之任何投與或施加，且包括抑制疾病或疾病進展、抑制或減慢疾病或其進展、抑制其發展、部分或完全緩解疾病、部分或完全緩解疾病之一或多種症狀或恢復或修復損失、丟失或有缺陷之功能；或刺激低效過程。術語「治療」亦包括降低任何表型特徵之嚴重程度及/或降低該特徵之發生率、程度或可能性。需要治療之彼等患者包括彼等已患有病症之患者以及彼等處於病症復發之風險中之患者或彼等要預防或減慢病症復發之患者。

【0176】 術語「有效量」或「治療有效量」係指藥物有效治療個體之疾病或病症之量。在一些實施例中，有效量係指在必要劑量下且持續必要時間段有效實現所需治療或預防結果之量。本發明之抗體之治療有效量可根據諸如疾病狀態、個體之年齡、性別及體重及拮抗劑在個體中引發所需反應之能力等因素而改變。治療有效量涵蓋其中本發明抗體之任何毒性或有害作用均被治療有益效應超過之量。

【0177】 「預防有效量」係指在必要之劑量下且持續必要時間段有效實現所需預防結果之量。典型地，但不一定，由於預防劑量係在疾病之前或早期在個體中使用，故預防有效量將小於治療有效量。

【0178】 「醫藥學上可接受之載劑」係指無毒之固體、半固體或液體填料、稀釋劑、囊封材料、調配助劑或習知在此項技術中與治療劑一起使用之載劑，

該載劑與治療劑一起構成用於向個體投與之「醫藥組合物」。醫藥學上可接受之載劑在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒且與調配物之其他成分相容。醫藥學上可接受之載劑適合於所採用之調配。舉例而言，若要經口投與治療劑，則載劑可為凝膠膠囊。若要皮下投與治療劑，則載劑理想地對皮膚沒有刺激性且不引起注射部位之反應。

【0179】　「製品」為任何制造物(例如包裝或容器)或套組，其包含至少一種試劑，例如用於治療疾病或病症之藥劑，或用於特定而言偵測本文所描述之生物標記物的探針。在一些實施例中，以用於進行本文所描述之方法的單元之形式對製造物或套組進行促銷、分配或出售。

3.　使用方法，諸如治療癌症之方法

【0180】　本文所描述之發明提供用於治療人類及其他非人類哺乳動物之方法中的抗CXCR5抗體。

【0181】　在一些實施例中，提供用於治療或預防癌症之方法，該等方法包括向需要此類治療之個體投與有效量之本發明抗CXCR5抗體或其抗原結合片段中之任一者。

【0182】　在一些實施例中，提供治療癌症之方法，其中該等方法包括向患有癌症之個體投與本發明抗CXCR5抗體或其抗原結合片段中之任一者。

【0183】　可藉由本發明之方法/用途治療之癌症包括本文/上文所描述之彼等癌症中之任一者。

【0184】　本文提供可使用本發明抗CXCR5抗體或其抗原結合片段中之任一者治療之非限制性示例性癌症，包括癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。此類癌症之更特定非限制性實例包括黑素瘤、子宮頸癌、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食管癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸道癌、胰腺癌、膠質母細胞瘤、卵巢癌、

肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney cancer/renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、腦癌、子宮內膜癌、睾丸癌、膽管細胞癌、膽囊癌、胃癌、黑素瘤及各種類型之頭頸癌。

【0185】 在某些實施例中，癌症為黑素瘤、乳癌、結腸癌、子宮頸癌、腎癌、肝癌(例如肝細胞癌)、肺癌(NSCLC)、卵巢癌、皮膚癌(例如鱗狀細胞癌或基底細胞癌)、淋巴瘤或白血病。

【0186】 在一些實施例中，本發明之抗CXCR5抗體可單獨使用，或者與已知能夠治療疾病或適應症之任何其他合適之化合物(例如抗癌劑)組合使用。

【0187】 換句話說，當用途為治療癌症時，抗體可與針對癌症之已知療法(諸如手術、放射療法、化學療法或其組合)組合使用。舉例而言，抗體可與過繼性免疫療法組合使用，該過繼性免疫療法由一或多次注射針對腫瘤性抗原(特定而言EBV抗原)之效應淋巴細胞組成。根據一些態樣，與根據本發明用於癌症療法之針對CXCR5之抗體組合使用之其他抗癌劑包括抗血管生成劑。根據某些態樣，抗體可與細胞因子(例如刺激抗腫瘤免疫反應之細胞因子)共投與。

【0188】 在此類組合療法中，本發明之抗體可在第二治療劑之前、之後或與其同時使用。關於組合療法參見以下其他部分。

【0189】 本發明之一個相關態樣提供一種降低CXCR5活性之方法，該方法包括向有需要之個體治療投與有效量之如本文所描述之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0190】 本發明之一個相關態樣提供一種治療炎性疾病之方法，該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0191】 本發明之一個相關態樣提供一種治療需要免疫抑制之個體的方法，

該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0192】　本發明之一個相關態樣提供一種治療自體免疫疾病、病症或疾患之方法，該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0193】　本發明之一個相關態樣提供一種降低有需要之個體中表現CXCR5之細胞的數目之方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0194】　在某些實施例中，細胞在其表面表現CXCR5。在某些實施例中，細胞為B細胞及Tfh樣細胞。

【0195】　在某些實施例中，個體為人類。

【0196】　在某些實施例中，該方法包括靜脈內或皮下投與抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0197】　在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段或醫藥組合物係約每週兩次、每週一次、每兩週一次、每三週一次、每四週一次、每五週一次、每六週一次、每七週一次、每八週一次、每九週一次、每十週一次、每月兩次、每月一次、每兩個月一次、每三個月一次、每四個月一次、每五個月一次、每六個月一次、每七個月一次、每八個月一次、每九個月一次、每十個月一次、每十一個月一次或每十二個月一次地進行投與。

【0198】　本發明之一個相關態樣提供一種降低之樣品中CXCR5+細胞之數目的方法，該方法包括使該細胞與本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物接觸。

【0199】　本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用作藥劑。

【0200】　本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用於降低個體中之CXCR5的活性。

【0201】　本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用於治療需要免疫抑制之個體。

【0202】　本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用於治療個體之自體免疫疾病、病症或疾患。

【0203】　本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段在用於治療免疫性疾病、病症或疾患之藥劑之製造中的用途。

【0204】　本發明之一個相關態樣提供本發明之醫藥組合物在用於治療免疫性疾病、病症或疾患之藥劑之製造中的用途。

【0205】　本發明之一個相關態樣提供一種治療醫學疾患之方法，該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0206】　在某些實施例中，疾患選自由以下組成之群：炎性反應，諸如炎性皮膚疾病，包括銀屑病及皮炎(例如異位性皮炎)；皮肌炎；系統性硬皮病及硬化；與炎性腸道疾病(諸如克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)相關之反應；呼吸窘迫症候群(包括成人呼吸窘迫症候群；ARDS)；皮炎；腦膜炎；腦炎；葡萄膜炎；結腸炎；胃炎；腎小球性腎炎；過敏性疾患，諸如濕疹及哮喘及涉及T細胞浸潤之其他疾患及慢性炎性反應；動脈粥樣硬化；白細胞黏附缺陷；類風濕性關節炎；系統性紅斑狼瘡(SLE)；糖尿病(例如I型糖尿病或胰島素依賴型糖尿病)；多發性硬化；雷諾氏症候群(Reynaud's syndrome)；自體免疫甲狀腺炎；過敏性腦脊髓炎；休格蘭症候群；幼年發作型糖尿病；及與由典型地存在於結核病、類肉瘤病、多肌炎、肉芽腫病及血管炎中之細胞因子及T-淋巴細胞介導的急性及遲發過敏性相關之免疫反應；韋格納氏病(Wegener's disease)；惡性貧血

(阿狄森氏病(Addison's disease))；涉及白細胞血球滲出之疾病；中樞神經系統(CNS)炎性病症；多器官損傷症候群；溶血性貧血(包括但不限於冷沈球蛋白血症或庫姆斯試驗陽性貧血(Coombs positive anemia))；重症肌無力；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜疾病；抗磷脂症候群；過敏性神經炎；格雷夫斯氏病；蘭伯特-伊頓肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)；大皰性類天疱瘡；天疱瘡；自體免疫多內分泌腺病；白斑病；萊特爾氏病(Reiter's disease)；僵人症候群；白塞氏病(Bechet disease)；巨細胞性動脈炎；免疫複合物性腎炎；IgA腎病變；IgM多發性神經病變；免疫血小板減少性紫癜(ITP)或自體免疫血小板減少症及自體免疫溶血性疾病；橋本氏甲狀腺炎；自體免疫肝炎；自體免疫血友病；自體免疫淋巴增生性症候群(ALPS)；自體免疫葡萄膜視網膜炎；格林-巴利症候群(Guillain-Barre syndrome)；古巴士德氏症候群；混合結締組織病；自體免疫相關不孕症；多發性結節性動脈炎；斑禿；自發性黏液性水腫；移植物抗宿主疾病；肌營養不良(杜興氏(Duchenne)肌營養不良、貝克爾(Becker)肌營養不良、肌強直性肌營養不良、肢帶型肌營養不良、面肩肱型肌營養不良、先天性肌營養不良、眼咽型肌營養不良、遠端型肌營養不良、埃-德型(Emery-Dreifuss)肌營養不良)以及控制表現CXCR5之癌細胞(諸如胰腺癌、結腸癌、膀胱癌、T細胞白血病及B細胞白血病)之增殖。在某些實施例中，疾病為SLE或類風濕性關節炎。

【0207】　在某些實施例中，疾病為休格蘭症候群。

【0208】　本發明之一個相關態樣提供一種使用本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物偵測樣品、組織或細胞中之CXCR5之方法，該方法包括使樣品、組織或細胞與抗體接觸及偵測抗體。

【0209】　本發明之一個相關態樣提供一種使用本發明之抗體或其抗原結合片段偵測樣品、組織或細胞中之CXCR5之方法，該方法包括使樣品、組織或細胞

與抗體接觸及偵測抗體。

【0210】　本發明之一個相關態樣提供一種抑制有需要之個體中之體液免疫反應之方法，該方法包括投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0211】　在某些實施例中，抗體介導選自由以下組成之群的至少一種表現CXCR5之細胞之消耗：脾臟中之Tfh細胞、外周血中之B細胞及外周血中之Tfh樣細胞。

4.　投藥途徑及載劑

【0212】　在各個實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可皮下或靜脈內投與。為簡單起見，「本發明抗CXCR5單株抗體」係指本發明之小鼠-人類嵌合抗CXCR5抗體，以及其人類化變異體。

【0213】　在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可藉由各種途徑在活體內投與，包括但不限於經口、動脈內、非經腸、鼻內、肌肉內、心內、心室內、氣管內、經頰、經直腸、腹膜內、藉由吸入、真皮內、經表面、經真皮及鞘內，或以其他方式，例如藉由植入。

【0214】　在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可經由靜脈內或皮下方式投與。

【0215】　本發明抗體組合物可調配成呈固體、半固體、液體或氣態形式之製劑；包括但不限於錠劑、膠囊、粉末、顆粒、軟膏、溶液、栓劑、灌腸劑、注射劑、吸入劑及氣溶膠。

【0216】　在各個實施例中，包含本發明抗CXCR5單株抗體之組合物與多種醫藥學上可接受之載劑一起提供於調配物中(參見例如Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 第20版(2003)；Ansel等人, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第

7版，Lippencott Williams and Wilkins (2004)；Kibbe等人，Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, Pharmaceutical Press (2000))。包括媒劑、佐劑及稀釋劑之各種醫藥學上可接受之載劑為可獲得的。此外，各種醫藥學上可接受之助劑物質，諸如pH值調節及緩衝劑、張力調節劑、穩定劑、潤濕劑及類似物亦為可獲得的。非限制性示例性載劑包括鹽水、緩衝鹽水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其組合。

【0217】 在各個實施例中，包含本發明抗CXCR5單株抗體之組合物可經調配用於注射，包括藉由將其溶解、懸浮或乳化於水性或非水溶劑(諸如植物油或其他油、合成脂族酸甘油酯、高碳脂肪酸之酯或丙二醇)中來進行皮下投與；且(若需要)具有習知添加劑，諸如增溶劑、等張劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑及防腐劑。

【0218】 在各個實施例中，組合物可經調配用於例如使用加壓可接受之噴射劑(諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮及類似物)進行吸入。

【0219】 在各個實施例中，組合物亦可諸如使用可生物降解或不可生物降解之聚合物調配至持續釋放微膠囊中。非限制性示例性可生物降解調配物包括聚乳酸-乙醇酸(PLGA)聚合物。非限制性示例性不可生物降解調配物包括聚甘油脂肪酸酯。製備此類調配物之某些方法描述於例如EP 1125584 Al中。

【0220】 亦提供包括一或多個容器之醫藥劑量包裝，其各自含有一或多個劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在一些實施例中，提供單位劑量，其中單位劑量含有預定量之包含本發明抗CXCR5單株抗體之組合物且具有或不具有一或多種其他劑。在一些實施例中，此類單位劑量供應於用於注射之一次性預填充注射器中。在各個實施例中，單位劑量中所含之組合物可包含鹽水、蔗糖或類似物；緩衝液，諸如磷酸鹽或類似物；及/或在穩定且有效之pH值範圍內調配。或者，在一些實施例中，組合物可以凍乾粉末之形式提供，該凍乾粉末可在添

加適當液體(例如無菌水)後復原。在一些實施例中，組合物包含抑制蛋白質聚集之一或多種物質，包括但不限於蔗糖及精胺酸。在一些實施例中，本發明之組合物包含肝素及/或蛋白聚醣。

【0221】 醫藥組合物以有效治療或預防特定適應症之量投與。治療有效量典型地取決於所治療之個體的體重、其身體或健康狀況、所要治療之疾患的程度或所治療之個體的年齡。

【0222】 在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約50 μg至每公斤體重約50 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約100 μg至每公斤體重約50 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約100 μg至每公斤體重約20 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約0.5 mg至每公斤體重約20 mg範圍內之量投與。

【0223】 在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約10 mg至約1,000 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約20 mg至約500 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約20 mg至約300 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約20 mg至約200 mg範圍內之量投與。

【0224】 本發明抗CXCR5單株抗體組合物可按需要向個體投與。在一些實施例中，向個體投與一或多次有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在各個實施例中，每月一次、不到每月一次(諸如每兩個月、每三個月或每六個月一次)向個體投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在其他實施例中，超過一個月一次(諸如每兩週一次、每週一次、每週兩次、每週三次、每天一次或每天多

次)投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。至少一次向個體投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在一些實施例中，可多次投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體，包括持續至少一個月、至少六個月或至少一年之時間。在一些實施例中，按需要向個體投與本發明抗CXCR5單株抗體以緩解疾患之一或多種症狀。

5. 組合療法

【0225】 本發明之本發明抗CXCR5單株抗體，包括其功能片段，可與用於治療疾病之其他生物活性物質或其他治療程序組合向有需要之個體投與。舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可單獨或與其他治療模式一起投與。其可在其他治療模式(諸如放射療法)之前、實質上與其同時或在其之後提供。

【0226】 為治療癌症，本發明抗CXCR5單株抗體可結合抗癌劑中之一或多者(諸如免疫檢查點抑制劑、化學治療劑、生長抑制劑、抗血管生成劑或抗贅生組合物)進行投與。

【0227】 在某些實施例中，特異性結合於CXCR5之本發明抗CXCR5單株抗體(「CXCR5結合拮抗劑」) (例如CXCR5拮抗劑抗體)或其抗原結合片段與第二拮抗劑(諸如免疫檢查點抑制劑，例如PD-1或PD-L1路徑之抑制劑)一起向患有其中刺激免疫系統將有益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體投與。例如如下文關於本發明抗CXCR5單株抗體與免疫腫瘤劑之組合所描述，兩種拮抗劑可同時或連續投與。可將一或多種其他治療劑(例如檢查點調節劑)添加至使用本發明抗CXCR5單株抗體來治療癌症或自體免疫疾病之治療中。

【0228】 在某些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體與另一治療一起同時或連續地向個體(例如患有癌症之個體)投與。舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可與以下中之一或多者一起投與：放射療法、手術或化學療法，例如靶向化學療法或免疫療法。

【0229】 在某些實施例中，一種治療患有癌症之個體之方法包括向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及一或多種免疫腫瘤劑，諸如免疫檢查點抑制劑。

【0230】 免疫療法(例如使用免疫腫瘤劑之療法)有效增強、刺激及/或上調個體中之免疫反應。在一個態樣中，將本發明抗CXCR5單株抗體與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)一起投與在癌症之治療中(例如在抑制腫瘤生長中)具有協同效應。

【0231】 在一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體在投與免疫腫瘤劑之前依序投與。在一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)同時投與。在又一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體在投與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)之後依序投與。可相隔例如30分鐘、60分鐘、90分鐘、120分鐘、3小時、6小時、12小時、24小時、36小時、48小時、3天、5天、7天或一或多週之時開始兩種劑之投與，或可在已投與第一劑之後例如30分鐘、60分鐘、90分鐘、120分鐘、3小時、6小時、12小時、24小時、36小時、48小時、3天、5天、7天或一或多週之時開始投與第二劑。

【0232】 在某些態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑(例如PD-1抑制劑)為同時向患者投與，例如同時輸注，例如歷時30或60分鐘之時間。本發明抗CXCR5單株抗體可與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)共調配。

【0233】 免疫腫瘤劑包括例如小分子藥物、抗體或其片段或其他生物劑或小分子。生物免疫腫瘤劑之實例包括但不限於抗體、抗體片段、疫苗及細胞因子。在一個態樣中，抗體為單株抗體。在某些態樣中，單株抗體為人類化抗體或人類抗體。

【0234】 在一個態樣中，免疫腫瘤劑為(i)刺激(包括共刺激)分子(例如受體或配位體)之促效劑或者(ii)免疫細胞(例如T細胞)上之抑制(包括共抑制)分子(例如受體或配位體)之拮抗劑，此兩者使得放大抗原特異性T細胞反應。在某些態樣

中，免疫腫瘤劑為(i)刺激(包括共刺激)分子(例如受體或配位體)之促效劑或者(ii)參與先天免疫之細胞(例如NK細胞)上之抑制(包括共抑制)分子(例如受體或配位體)之拮抗劑，且其中免疫腫瘤劑增強先天免疫。此類免疫腫瘤劑常常稱為免疫檢查點調控因子，例如免疫檢查點抑制劑或免疫檢查點刺激劑。

【0235】 在某些實施例中，免疫腫瘤劑可為靶向(或特異性結合於)膜結合配位體之B7家族之成員的藥劑，膜結合配位體之B7家族包括B7-1、B7-2、B7-H1 (PD-L1)、B7-DC (PD-L2)、B7-H2 (ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5及B7-H6；或特異性結合於B7家族成員之共刺激或共抑制受體。免疫腫瘤劑可為靶向膜結合配位體之TNF家族之成員的藥劑或與其特定性結合之共刺激或共抑制受體，例如TNF受體家族成員。可由免疫腫瘤劑靶向之示例性TNF及TNFR家族成員包括CD40及CD40L、OX-40、OX-40L、GITR、GITRL、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137 (4-1BB)、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fnl4、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LTfiR、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素α/TNPβ、CXCR5、TNFa、LTfiR、淋巴毒素a 1β2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY及NGFR。可與本發明抗CXCR5單株抗體組合使用以便治療癌症之免疫腫瘤劑可為例如以下藥劑：靶向B7家族成員之抗體、B7受體家族成員、TNF家族成員或TNFR家族成員，諸如上文所描述之彼等物質。

【0236】 在一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體與以下中之一或多者一起投與：(i)抑制T細胞活化之蛋白質(例如免疫檢查點抑制劑) (諸如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM3、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、

GARP、PDIH、LAIR1、TIM-1、TIM-4及PSGL-1)的拮抗劑；及(ii)刺激T細胞活化之蛋白質(諸如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB (CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、CD40L、DR3及CD28H)的促效劑。

【0237】 在一個態樣中，免疫腫瘤劑為對抑制T細胞活化之細胞因子(例如IL-6、IL-10、TGF-β、VEGF及其他免疫抑制細胞因子)進行抑制的藥劑(亦即，其拮抗劑)或為刺激T細胞活化且刺激免疫反應之細胞因子(諸如IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21及IFNα)之促效劑(例如細胞因子本身)。

【0238】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合用於刺激免疫系統(例如用於治療癌症及感染性疾病)之其他藥劑包括NK細胞上之抑制受體之拮抗劑或NK細胞上之活化受體之促效劑。舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可與KIR之拮抗劑組合。

【0239】 用於組合療法之其他藥劑包括抑制或消耗巨噬細胞或單核細胞之藥劑，包括但不限於CSF-IR拮抗劑，諸如CSF-IR拮抗劑抗體，包括RG7155 (WO11/70024、WO11/107553、WO11/131407、WO13/87699、WO13/119716、WO13/132044)或FPA008 (WO11/140249；WO13169264；WO14/036357)。

【0240】 免疫腫瘤劑亦包括抑制TGF-β信號傳導之藥劑。

【0241】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合之其他藥劑包括增強腫瘤抗原呈遞之藥劑，例如樹突細胞疫苗、GM-CSF分泌細胞疫苗、CpG寡核苷酸及咪喹莫特(imiquimod)，或增強腫瘤細胞之免疫原性的療法(例如蒽環類)。

【0242】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合之其他療法包括消耗或阻斷T_{reg}細胞之療法，例如特異性結合於CD25之藥劑。

【0243】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合之另一療法為抑制代謝酶(諸如吲哚胺加雙氧酶(IDO)、加雙氧酶、精胺酸酶或氧化氮合成酶)之療法。

【0244】　可使用之另一類別之藥劑包括抑制腺苷形成或抑制腺苷A2A受體之藥劑。

【0245】　可與本發明抗CXCR5單株抗體組合用於治療癌症之其他療法包括逆轉/阻止T細胞無力或耗竭之療法及觸發腫瘤位點處之先天免疫活化及/或炎症之療法。

【0246】　本發明抗CXCR5單株抗體可與超過一種免疫腫瘤劑(諸如免疫檢查點抑制劑)組合，且可例如與靶向多個免疫路徑元件之組合方法組合，該組合方法為諸如以下中之一者或多者：增強腫瘤抗原呈遞之療法(例如樹突細胞疫苗、GM-CSF分泌細胞疫苗、CpG寡核苷酸、咪喹莫特)；抑制負向免疫調控之療法，例如藉由抑制CTLA-4及/或PD1/PD-L1/PD-L2路徑及/或消耗或阻斷Treg或其他免疫抑制細胞；刺激正向免疫調控之療法，例如使用刺激CD-137、OX-40及/或GITR路徑及/或刺激T細胞效應功能之促效劑；系統性地增加抗腫瘤T細胞之頻率之療法；例如使用CD25之拮抗劑(例如達利珠單抗(daclizumab))或藉由離體抗CD25珠粒消耗消耗或抑制Treg (諸如腫瘤中之Treg)之療法；影響腫瘤中抑制骨髓細胞之功能的療法；增強腫瘤細胞之免疫原性之療法(例如蒽環類)；包括基因修飾之細胞(例如由嵌合抗原受體修飾之細胞)的過繼性T細胞或NK細胞轉移(CAR-T療法)；抑制代謝酶(諸如吲哚胺加雙氧酶(IDO)、加雙氧酶、精胺酸酶或氧化氮合成酶)之療法；逆轉/阻止T細胞無力或耗竭之療法；觸發腫瘤位點處之先天免疫活化及/或炎症之療法；投與免疫刺激細胞因子或阻斷免疫抑制細胞因子。

【0247】　舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可與以下物質一起使用：連結正向共刺激受體之一或多種激動劑；通過抑制受體減弱信號傳導之一或多種拮抗劑(阻斷劑)，諸如克服腫瘤微環境內之獨特免疫抑制路徑(例如阻斷PD-L1/PD-1/PD-L2相互作用)之拮抗劑；系統性地增加抗腫瘤免疫細胞(諸如T細胞)

之頻率、消耗或抑制Treg (例如藉由抑制CD25)之一或多種藥劑；抑制代謝酶(諸如IDO)之一或多種藥劑；逆轉/阻止T細胞無力或耗竭之一或多種藥劑；及觸發腫瘤位點處之先天免疫活化及/或炎症之一或多種藥劑。

【0248】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為CTLA-4拮抗劑，諸如拮抗性CTLA-4抗體。合適之CTLA-4抗體包括例如YERVOY (伊匹單抗)或曲美木單抗(tremelimumab)。

【0249】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為PD-1拮抗劑，諸如拮抗性PD-1抗體。合適之PD-1抗體包括例如OPDIVO (納武單抗(nivolumab))、KEYTRUDA (派姆單抗(pembrolizumab))或MEDI-0680 (AMP-514；WO2012/145493)。免疫腫瘤劑亦可包括皮地利珠單抗(pidilizumab) (CT-011)。用於靶向PD-1受體之另一方法為由PD-L2之細胞外結構域(B7-DC)融合至IgGl之Fc部分組成之重組蛋白，稱為AMP-224。

【0250】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為PD-L1拮抗劑，諸如拮抗性PD-Ll抗體。合適之PD-L1抗體包括例如MPDL3280A (RG7446；WO2010/077634)、德瓦魯單抗(durvalumab) (MEDI4736)、BMS-936559 (WO2007/005874)、MSB0010718C (WO2013/79174)或rHigM12B7。

【0251】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為LAG-3拮抗劑，諸如拮抗性LAG-3抗體。合適之

LAG3抗體包括例如BMS-986016 (WO10/19570、WO14/08218)或IMP-731或IMP-321 (WO08/132601、WO09/44273)。

【0252】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為CD137 (4-1BB)促效劑，諸如促效性CD137抗體。合適之CD137抗體包括例如烏瑞魯單抗(urelumab)或PF-05082566 (W012/32433)。

【0253】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為GITR促效劑，諸如促效性GITR抗體。合適之GITR抗體包括例如TRX-518 (WO06/105021、WO09/009116)、MK-4166 (WO 11/028683)或WO2015/031667中揭示之GITR抗體。

【0254】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為OX40促效劑，諸如促效性OX40抗體。合適之OX40抗體包括例如MEDI-6383、MEDI-6469或MOXR0916 (RG7888；WO06/029879)。

【0255】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為CD40促效劑，諸如促效性CD40抗體。在某些實施例中，免疫腫瘤劑為CD40拮抗劑，諸如拮抗性CD40抗體。合適之CD40抗體包括例如魯卡妥木單抗(lucatumumab) (HCD122)、達西珠單抗(dacetuzumab) (SGN-40)、CP-870,893或Chi Lob 7/4。

【0256】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)

之個體，其中免疫腫瘤劑為CD27促效劑，諸如促效性CD27抗體。合適之CD27抗體包括例如萬利魯單抗(varlilumab) (CDX-1127)。

【0257】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為MGA271 (針對B7H3) (WOl 1/109400)。

【0258】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為KIR拮抗劑，諸如利麗單抗(lirilumab)。

【0259】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為IDO拮抗劑。合適之IDO拮抗劑包括例如INCB-024360 (WO2006/122150、WO07/75598、WO08/36653、WO08/36642)、吲哚莫德(indoximod)、NLG-919 (WO09/73620、WO09/1156652、WOl 1/56652、WO 12/142237)或F001287。

【0260】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為鐘樣受體促效劑，例如TLR2/4促效劑(例如卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin))；TLR7促效劑(例如喜通諾(Hiltonol)或咪喹莫特(Imiquimod))；TLR7/8促效劑(例如瑞喹莫特(Resiquimod))；或TLR9促效劑(例如CpG7909)。

【0261】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為TGF-β抑制劑，例如GC1008、LY2157299、TEW7197或IMC-TR1。

6. 示例性抗CXCR5單株抗體

【0262】 本文所描述之發明提供對CXCR5具特異性之單株抗體，或其抗原結合片段。

【0263】 因此，本發明之一個態樣提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其與本文所描述之分離之單株抗體或其抗原結合片段中之任一者競爭結合至hCXCR5，或結合至由HFB2-4或其Hz變異體結合之抗原決定基。

【0264】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段為人類-小鼠嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、CDR接枝抗體或表面重修抗體。

【0265】 在一些實施例中，其抗原結合片段為Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【0266】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有增強ADCC之經工程改造之Fc區，諸如本文/上文所描述之彼等，包括雙重突變hG1DE。

【0267】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5具特異性，例如實質上不與CXCR3交叉反應，及/或實質上不與小鼠或食蟹猴CXCR5交叉反應。

【0268】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段對hCXCR5具有≤1 μM、≤100 nM、≤50 nM、≤25 nM、≤20 nM、≤15 nM、≤10 nM、≤5 nM、≤2 nM、≤1 nM、≤0.1 nM、≤0.01 nM或≤0.001 nM (例如10^{-8} M或更小，例如10^{-8} M至10^{-13} M，例如10^{-9} M至10^{-13} M)之解離常數(K_d)。

【0269】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段結合至由HFB2-4或其Hz變異體(諸如Hz9、Hz12、Hz14、Hz15、Hz37、Hz38、Hz39、

Hz40、Hz41及Hz42)結合之抗原決定基。

【0270】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段以EC50為約0.4至4 nM (諸如約0.9 nM或約1.2 nM)之表觀親和力結合細胞上所表現之hCXCR5。

【0271】 在某些實施例中，在cAMP報告子分析中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段以約0.5至3.5 nM (諸如約0.49 nM)之EC50拮抗CXCR5-CXCL13信號傳導。

【0272】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段針對表現hCXCR5之細胞展現EC50小於0.1 nM (例如0.001至0.1 nM，諸如約0.002 nM)之ADCC活性。

【0273】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段介導NK細胞以小於0.1 fM.或約0.3 aM至0.8 pM之EC50殺死表現hCXCR5之人類B細胞。

【0274】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段結合hCXCR5，但並不可偵測地結合人類趨化因子受體CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7及XCR1。

【0275】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段消耗外周血中之B細胞，視情況可逆地消耗外周血中之B細胞。

【0276】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段消耗外周血及/或脾臟中之Tfh樣細胞。

【0277】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段抑制CXCR5結合至CXCL13。

【0278】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段抑制CXCL13對細胞中以其他方式由佛司可林(forskolin)觸發而產生cAMP之抑制作

用，從而使得cAMP水準與不存在抗體或其抗原結合片段情況下之cAMP水準相比有所增加(例如以約0.4至3.5 nM (諸如約0.49 nM)之EC50抑制CXCL13對產生cAMP之抑制作用)。視情況，對CXCL13抑制之最大抑制為至少約60%、70%或80%。

【0279】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段在人類供體外周血單核細胞(PBMC)中觸發表現CXCR5之細胞之ADCC。

【0280】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合hCXCR5且與本發明之抗體或其抗原結合片段中之任一者競爭。

表A：示例性抗人類CXCR5抗體之CDR、構架(FR)、可變重鏈及可變輕鏈

抗體		序列	SEQ ID NO:
HFB2-1	VH CDR1	GFTFSNYW	1
	VH CDR2	IRLKSDNYAT	2
	VH CDR3	TPPNFDY	3
	VH FR1	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS	4
	VH FR2	MNWVRQSPEKGLEWVAQ	5
	VH FR3	HYTESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYC	6
	VH FR4	WGQGTTLTVSS	7
	VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNW VRQSPEKGLEWVAQIRLKSDNYATHYTESVKGRFTISR DDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTPPNFDYWGQGTT LTVSS	8
	VL CDR1	TSLLHRSGKHK	9
	VL CDR2	YVS	10
	VL CDR3	MQSLEFPLT	11
	VL FR1	DIVMTQAAPSVTVTPGESVTISCRST	12
	VL FR2	FYWFLQRPGQSPQLLIY	13
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDFGVYYC	14
	VL FR4	FGTGTKLEIK	15
	VL	DIVMTQAAPSVTVTPGESVTISCRSTTSLLHRSGKHKFY WFLQRPGQSPQLLIYYVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFT LRISRVEAEDFGVYYCMQSLEFPLTFGTGTKLEIK	16
HFB2-2	VH CDR1	GFTFNTNA	17
	VH CDR2	IRSKSNNYAT	18
	VH CDR3	VSWDPFAY	19
	VH FR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20
	VH FR2	MNWVRQAPGKGLEWVAR	21
	VH FR3	HYVDSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMY YC	22

	VH FR4	WGQGTLVTVSA	23
	VH	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATHYVDSVKDRFTIS RDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVSWDPFAYWG QGTLVTVSA	24
	VL CDR1	QSVLYSSNQKNY	25
	VL CDR2	WAS	26
	VL CDR3	HQYLSSWT	27
	VL FR1	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	28
	VL FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	29
	VL FR3	TRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQTEDLAVYYC	30
	VL FR4	FGGGAKLEIK	31
	VL	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKN YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRASGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQTEDLAVYYCHQYLSSWTFGGGAKLEIK	32
HFB2-3	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	TWSGGRT	34
	VH CDR3	ARGGNY	35
	VH FR1	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVS	36
	VH FR2	VHWVRQSPGKGLEWLGV	37
	VH FR3	DYNAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVNDTAIYYC	38
	VH FR4	WGQGTSVTVSS	39
	VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVR QSPGKGLEWLGVTWSGGRTDYNAAFISRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQVNDTAIYYCARGGNYWGQGTSVTVSS	40
	VL CDR1	ESVDNYGISF	41
	VL CDR2	AAS	42
	VL CDR3	QQSKEVPWT	43
	VL FR1	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRAS	44
	VL FR2	MNWFQQKPGQPPKLLIY	45
	VL FR3	NQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC	46
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNW FQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDQVQ LKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPG KGLEWLGVIWGDGSTNYHSTLISRLSISKDNSKSQVFL KLNSLQTDDTATYYCARVAYWGQGTLVTVSAFSLNIH PMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK	48
HFB2-4	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS	52
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWLGV	53
	VH FR3	NYHSGLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATYYC	54
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	55
	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVR QPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLSISKDNSKS QVFLKLNSLQSDDTATYYCARVVYWGQGTLVTVSA	56
	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57

	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISCRSS	60
	VL FR2	LYWFLQRPGQSPQLLLY	61
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC	62
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISCRSSKSLLHSNGKTYLY WFLQRPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFT LRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK	63
HFB2-5	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVAY	65
	VH FR1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS	52
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWLGV	53
	VH FR3	NYHSTLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQTDDTATYYC	64
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	55
	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVR QPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSTLISRLSISKDNSKS QVFLKLNSLQTDDTATYYCARVAYWGQGTLVTVSA	65
	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSS	66
	VL FR2	LYWFLQRPGQSPQLLIY	67
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC	62
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGKTYLY WFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFT LRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK	68
HFB2-6	VH CDR1	GYTFTDYT	69
	VH CDR2	IYPGSGNI	70
	VH CDR3	ARGLRREFAY	71
	VH FR1	QIQLQQSGPELVEPGASVKLSCKAS	72
	VH FR2	IHWVKQSPGQGLEWIGW	73
	VH FR3	KYNDKFKGKATMTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	74
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	55
	VH	QIQLQQSGPELVEPGASVKLSCKASGYTFTDYTIHWVK QSPGQGLEWIGWIYPGSGNIKYNDKFKGKATMTADKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGLRREFAYWGQGTL VTVSA	75
	VL CDR1	KSLLHSNGITY	76
	VL CDR2	QMS	77
	VL CDR3	AQSLELPLT	78
	VL FR1	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS	79
	VL FR2	LYWYLQKPGQSPQLLIY	80
	VL FR3	NLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYC	81
	VL FR4	FGAGTKLELK	82

	VL	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFT LRISRVEAEDVGVYYCAQSLELPLTFGAGTKLELK	83

【0281】　在一些實施例中，本發明之抗人類CXCR5抗體或其抗原結合片段包含表A及表B中所列之任一抗體的至少一個、兩個或三個(例如所有三個)對應VH CDR。

【0282】　在一些實施例中，本發明之抗人類CXCR5抗體或其抗原結合片段包含表A及表C中所列之任一抗體的至少一個、兩個或三個(例如所有三個)對應VL CDR。

【0283】　在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 1、2及3之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 9、10及11之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0284】　在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 17、18及19之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 25、26及27之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0285】　在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、34及35之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 41、42及43之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0286】　在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0287】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、49及65之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0288】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 69、70及71之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 76、77及78之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0289】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 149、150及151之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0290】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 114、115及116之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 120、121及122之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0291】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段在本發明之抗體之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3中之任何一或多者中包含至多1、2、3、4或5 (例如至多1、2或3)個胺基酸殘基改變(例如缺失、插入或取代(例如保守取代))；及/或在本發明之抗體之VL CDR1、VH CDR2及VH CDR3中之任何一或多者中包含1、2、3、4或5 (例如至多1、2或3)個胺基酸殘基改變(例如缺失、插入或取代(例如保守取代))。

【0292】 根據本發明之抗人類CXCR5抗體或其抗原結合片段可使用如表A中所描述之胺基酸序列之構架區(FR)中之任一者，或與如表A中所描述之FR胺基

酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列來製備。在某些實施例中，重鏈FR區全部來自本文之相同例示抗體。在某些實施例中，輕鏈FR區全部來自本文之相同例示抗體。在某些實施例中，重鏈與輕鏈FR區均全部來自本文之相同例示抗體。

【0293】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含表A中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VH FR1)、重鏈構架區2 (VH FR2)、重鏈構架區3 (VH FR3)及/或重鏈構架區4 (VH FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VH FR1、VH FR2、VH FR3及/或VH FR4包含與如表A中所描述之任一抗體之對應VH FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0294】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 4、20、36、52或72之VH FR1，或與SEQ ID NO: 4、20、36、52或72實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0295】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 5、21、37、53或73之VH FR2，或與SEQ ID NO: SEQ ID NO: 5、21、37、53或73實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0296】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 6、22、38、54、64或74之VH FR3，或與SEQ ID NO: 6、22、38、54、64或74實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0297】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID

NO: 7、23、39或55之VH FR4，或與SEQ ID NO: 7、23、39或55實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0298】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含表A中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VL FR1)、重鏈構架區2 (VL FR2)、重鏈構架區3 (VL FR3)及/或重鏈構架區4 (VL FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VL FR1、VL FR2、VL FR3及/或VL FR4包含與如表A中所描述之任一抗體之對應VL FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0299】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 12、28、44、60、66或79之VL FR1，或與SEQ ID NO: 12、28、44、60、66或79實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0300】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 13、29、45、61、67或80之VL FR2，或與SEQ ID NO: 13、29、45、61、67或80實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0301】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14、30、46、62或81之VL FR3，或與SEQ ID NO: 14、30、46、62或81實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0302】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 15、31、47或82之VL FR4，或與SEQ ID NO: 15、31、47或82實質上一致

(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0303】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL構架序列及VH構架序列，且其中VL構架序列或VH構架序列之一者或兩者與衍生出它們之人類生殖系序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致，且其中衍生出VL構架序列之人類生殖系VL序列選自由以下組成之群：V1-22、Vλ共同序列、Vλ1共同序列、Vλ3共同序列、Vκ共同序列、Vκ1共同序列、Vκ2共同序列及Vκ3，且其中衍生出VH構架序列之人類生殖系VH序列選自由以下組成之群：VH3、VH5、VH1及VH4。

【0304】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL構架序列及VH構架序列，且其中VL構架序列及/或VH構架序列中之一者或兩者與衍生出它們之人類生殖系序列至少66%、76%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

【0305】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL構架序列及VH構架序列，且其中VL構架序列或VH構架序列中之一者或兩者與衍生出它們之人類生殖系序列相同。

【0306】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的。

【0307】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段展現增強之ADCC。

【0308】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含衍生自人類VH3生殖系序列之構架VH序列。

【0309】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含Fc結構域，諸如IgA (例如IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgM或IgG (例如IgG1、IgG2、

IgG3或IgG4)之Fc結構域。在某些實施例中，Fc結構域為IgG之Fc結構域，諸如(人類) IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之Fc結構域。

【0310】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段，其中抗體或抗原結合片段為Fc融合蛋白、單抗體(monobody)、大抗體(maxibody)、雙官能抗體、scFab、scFv、肽體。

【0311】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段以約為或小於選自由以下組成之群的值的K_D結合人類CXCR5：約10nM、5nM、2nM、1nM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、250pM、200pM、150pM、100pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、5pM及1pM。

【0312】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段在人類中具有約一(1)天至七(7)天之預測半衰期。

【0313】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段(包括人類化單株抗體或其抗原結合片段)具有良好可開發性型態，包括在高溫(例如25°C或40°C)、低pH值條件(例如pH3.5約室溫)下及/或在若干輪冷凍/解凍循環之後為穩定的。

【0314】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段(包括人類化單株抗體或其抗原結合片段)在胺基酸序列中包括經設計以改良抗體之可開發性的一或多個點突變。舉例而言，Raybould等人(Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling, *PNAS* 116(10): 4025-4030, 2019)描述了治療性抗體分析器(TAP)，其為構建可變結構域序列之可下載同源模型、針對五條可開發性準則對其進行測試且報告潛在序列傾向及典型形式的計算工具。作者進一步使TAP在opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/TAP.php可自由獲得。

【0315】 除實現對抗原之所需親和力外，治療性mAb開發仍存在許多障壁。此等障壁包括固有免疫原性、化學及構象不穩定性、自我締合、高黏度、多特異性及不良表現。舉例而言，特定而言在高度可變之互補決定區(CDR)中之高疏水性水準重複地與聚集、黏度及多特異性有關。重鏈及輕鏈可變結構域之淨電荷的不對稱性亦與高濃度下之自我締合及黏度相關。CDR中之正電荷及負電荷之補丁(patch)與高清除率及不良表現水準有關。產物異質性(例如通過氧化、異構化或糖基化)常常由容易發生轉譯後或轉譯時修飾之特定序列基元引起。計算工具可用於促進序列傾向之鑑定。Warszawski等人(Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces. *PLoS Comput Biol* 15(8): e1007207. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007207)亦描述了藉由可變輕-重鏈界面之自動化設計來優化抗體親和力及穩定性之方法。可獲得用於鑑定候選抗體之潛在可開發性問題之其他方法，且在本發明之較佳實施例中，可經由習知方法向候選抗體引入一或多個點突變以解決此類問題，從而產生優化之本發明之治療抗體。

7. 人類化抗體

【0316】 在一些實施例中，本發明之抗體為人類化抗體。人類化抗體適合作為治療劑分子，因為人類化抗體降低或消除人類對非人類抗體之免疫反應(諸如人類抗小鼠抗體(HAMA)反應)，人類對非人類抗體之免疫反應可產生對抗體治療劑之免疫反應，且降低治療劑之有效性。

【0317】 抗體可藉由任何標準方法來進行人類化。人類化之非限制性示例性方法包括描述於例如美國專利第5,530,101號；第5,585,089號；第5,693,761號；第5,693,762號；第6,180,370號；Jones等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann等人, Nature 332: 323-27 (1988)；Verhoeyen等人, Science 239: 1534-36

(1988)；及美國公開案第US 2009/0136500號中之方法。所有參考文獻均以引用之方式併入本文中。

【0318】　人類化抗體為其中非人類可變區之構架區中至少一個胺基酸已經來自人類構架區中對應位置之胺基酸置換的抗體。在一些實施例中，非人類可變區之構架區中至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少10個、至少11個、至少12個、至少15個或至少20個胺基酸經來自一或多個人類構架區中之一或多個對應位置之胺基酸置換。

【0319】　在一些實施例中，用於取代之對應人類胺基酸中之一些來自不同人類免疫球蛋白基因之構架區。換句話說，在一些此類實施例中，非人類胺基酸中之一或多者可經來自第一人類抗體之人類構架區之對應胺基酸置換或由第一人類免疫球蛋白基因編碼，非人類胺基酸中之一或多者可經來自第二人類抗體之人類構架區之對應胺基酸置換或由第二人類免疫球蛋白基因編碼，非人類胺基酸中之一或多者可經來自第三人類抗體之人類構架區之對應胺基酸置換或由第三人類免疫球蛋白基因編碼，等等。另外，在一些實施例中，單個構架區(例如FR2)中用於取代之所有對應人類胺基酸不需要來自相同人類構架。然而，在一些實施例中，用於取代之所有對應人類胺基酸來自相同人類抗體或由相同人類免疫球蛋白基因編碼。

【0320】　在一些實施例中，藉由將一或多個整個構架區用對應人類構架區置換來對抗體進行人類化。在一些實施例中，選擇與所置換之非人類構架區具有最高同源性水準之人類構架區。在一些實施例中，此類人類化抗體為CDR接枝抗體。

【0321】　在一些實施例中，在CDR接枝之後，一或多個構架胺基酸變回小鼠構架區中之對應胺基酸。在一些實施例中，進行此類「反突變」以保留似乎有助於CDR中之一或多者之結構及/或可參與抗原接觸及/或似乎與抗體之總結構

完整性有關之一或多個小鼠構架胺基酸。在一些實施例中，在CDR接枝之後對抗體之構架區進行十處或更少、九處或更少、八處或更少、七處或更少、六處或更少、五處或更少、四處或更少、三處或更少、兩處或更少、一處或零處反突變。

表B：衍生自HFB2-4之示例性人類化VH序列

VH序列		序列	SEQ ID NO:
HFB2-4hz-VH1	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	84
	VH FR2	VSWVRQAPGQGLEWMGV	85
	VH FR3	NYAQKFQGRVTITKDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	86
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKFQGRVTITKDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	88
HFB2-4hz-VH2	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	89
	VH FR2	VSWVRQAPGKGLEWVGV	90
	VH FR3	NYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYC	91
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWVGVIWGDGSTNYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	92
HFB2-4hz-VH3	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	93
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWIGV	94
	VH FR3	NYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC	95
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	96
HFB2-4hz-VH6	VH CDR1	GFSLTSYG	33

	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS	138
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWIGV	94
	VH FR3	NYNPSLKSRLTISKDKSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC	139
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRLTISKDKSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	140
HFB2-4hz-VH8	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVS	141
	VH FR2	VSWVRQAPGKGLEWLGV	142
	VH FR3	NYHSGLISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC	143
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	144
HFB2-4hz-VH10	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	132
	VH FR2	VSWVRQAPGQGLEWMGV	85
	VH FR3	NYAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC	133
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	113

表C：衍生自HFB2-4之示例性人類化VL序列

VL序列		序列	SEQ ID NO:
HFB2-4hz-VL1	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS	97
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLIY	98
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	99
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGS	101

		GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK	
HFB2-4hz-VL2	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS	97
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLLY	102
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC	99
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKT YLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK	137
HFB2-4hz-VL3	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSS	103
	VL FR2	LYWFQQKPGKAPKLLLY	104
	VL FR3	NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYY C	105
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGKAPKLLLYRMSNLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCMQHLEYPYT FGGGTKVEIK	106
HFB2-4hz-VL4	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSS	103
	VL FR2	LYWFQQKPGKAPKLLIY	107
	VL FR3	NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	108
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGKAPKLLIYRMSNLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCMQHLEYPYTFG GGTKVEIK	109
HFB2-4hz-VL6	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSS	134
	VL FR2	LYWFQQKPGQAPRLLIY	135
	VL FR3	NLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYY C	136
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSG SGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTF	112

		GQGTKLEIK	
HFB2-4hz-VL7	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSS	145
	VL FR2	LYWFQQKPGQSPKLLLY	146
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YC	147
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGQSPKLLLYRMSNLASGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCMQHLEYPYT FGQGTKLEIK	148
HFB2-4hz-VL1b	VL CDR1	QSLLHSNGYNY	149
	VL CDR2	RGS	150
	VL CDR3	MQHLQYPYT	151
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS	97
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLIY	98
	VL FR3	NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC	152
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGY NYLYWFLQKPGQSPQLLIYRGSNRASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLQYPYT FGGGTKVEIK	153
HFB2-4hz-VL1c	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPISLSCRSS	154
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLLY	102
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC	99
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPISLSCRSSKSLLHSNGKT YLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKLEIK	155

表D：衍生自HFB2-4之示例性人類化抗體

抗體		序列	SEQ ID NO:
HFB2-4hG1 (親本)	VH CDR1	GFSLTSYGVS	114
	VH CDR2	VIWGDGSTN	115
	VH CDR3	VVY	116
	VH FR1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS	52
	VH FR2	WVRQPPGKGLEWLG	117
	VH FR3	YHSGLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATY YCAR	118
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	119

	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLSI SKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATYYCARVVYWG QGTLVTVSA	56
	VL CDR1	RSSKSLLHSNGKTYLY	120
	VL CDR2	RMSNLAS	121
	VL CDR3	MQHLEYPYT	122
	VL FR1	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISC	123
	VL FR2	WFLQRPGQSPQLLL	124
	VL FR3	GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC	125
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISCRSSKSLLHSNGKT YLYWFLQRPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSG SGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKLEIK	111
HFB2-4hz37hG1	VH CDR1	GFSLTSYGVS	114
	VH CDR2	VIWGDGSTN	115
	VH CDR3	VVY	116
	VH FR1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	93
	VH FR2	WVRQPPGKGLEWIG	126
	VH FR3	YNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCAR	127
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH (VH3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVS WVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTI SKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS	96
	VL CDR1	RSSKSLLHSNGKTYLY	120
	VL CDR2	RMSNLAS	121
	VL CDR3	MQHLEYPYT	122
	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	128
	VL FR2	WFQQKPGQAPRLLIY	129
	VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYC	130
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL (VL6)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSG SGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK	112
HFB2-4hz42hG1	VH CDR1	GFSLTSYGVS	114
	VH CDR2	VIWGDGSTN	115
	VH CDR3	VVY	116
	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	132
	VH FR2	WVRQAPGQGLEWMG	133
	VH FR3	YAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCAR	134
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH (VH10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLTSYG VSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKLQ GRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	113

		VVYWGQGTLVTVSS	
	VL CDR1	RSSKSLLHSNGKTYLY	120
	VL CDR2	RMSNLAS	121
	VL CDR3	MQHLEYPYT	122
	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	128
	VL FR2	WFQQKPGQAPRLLIY	129
	VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYC	130
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL (VL6)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTFGQGTKLEIK	112

【0322】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含表B中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VH FR1)、重鏈構架區2 (VH FR2)、重鏈構架區3 (VH FR3)及/或重鏈構架區4 (VH FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VH FR1、VH FR2、VH FR3及/或VH FR4序列包含與如表B及表D中所描述之任一抗體之對應VH FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0323】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 84、85、86及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0324】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 89、90、91及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0325】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH

FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 93、94、95及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0326】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 138、94、139及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0327】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 141、142、143及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0328】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 132、85、133及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0329】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 93、126、127及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0330】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 132、133、134及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0331】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含表C中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VL FR1)、重鏈構架區2 (VL FR2)、重鏈構架區3 (VL FR3)及/或重鏈構架區4 (VL FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VL FR1、VL FR2、VL FR3及/或VL FR4包含與如表C及表D中所描述之任一抗體之對應VL FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0332】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 97、98、99及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0333】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 97、102、99及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0334】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4

序列分別包含與SEQ ID NO: 103、104、105及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0335】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 103、107、108及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0336】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 134、135、136及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0337】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 128、129、130及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0338】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 145、146、147及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0339】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL

FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 97、98、152及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0340】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 154、102、99及47之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

表E：衍生自HFB2-4之所選人類化抗體

抗體	VH	VL	VH序列	VL序列
HFB2-4hz2hG1	VH1	VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKFQGRVTITKDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 88)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 137)
HFB2-4hz5hG1	VH2	VL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWVGVIWGDGSTNYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 92)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 101)
HFB2-4hz6hG1	VH2	VL2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWVGVIWGDGSTNYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 92)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 137)
HFB2-4hz9hG1	VH3	VL1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 101)
HFB2-	VH3	VL2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASIS

4hz10hG1			CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS	CRSSKSLLHSNGKTYLYWFL QKPGQSPQLLLYRMSNLASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 137)
HFB2-4hz11hG1	VH3	VL3	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGKAPKLLLYRMSNLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 106)
HFB2-4hz12hG1	VH3	VL4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGKAPKLLIYRMSNLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 109)
HFB2-4hz14hG1	VH3	VL1b	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSQSLLHSNGYNYLYWFL QKPGQSPQLLIYRGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQHLQYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 153)
HFB2-4hz15hG1	VH3	VL1c	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPISLS CRSSKSLLHSNGKTYLYWFL QKPGQSPQLLLYRMSNLASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 155)
HFB2-4hz37hG1	VH3	VL6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQAPRLLIYRMSNLAS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSV QSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)
HFB2-4hz38hG1	VH3	VL7	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQSPKLLLYRMSNLAS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCMQHLEYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 148)
HFB2-4hz39hG1	VH6	VL6	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLT CAVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRLTISKDKSKNQVSLKL	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQAPRLLIYRMSNLAS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSV

			SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 140)	QSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)
HFB2-4hz41hG1	VH8	VL7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAVSGFSLTSYGVSWVRQA PGKGLEWLGVIWGDGSTNYH SGLISRLTISKDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVVY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 144)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQSPKLLLYRMSNLAS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCMQHLEYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 148)
HFB2-4hz42hG1	VH10	VL6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFSLTSYGVSWVRQA PGQGLEWMGVIWGDGSTNY AQKLQGRVTMTKDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARVV YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 113)	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQAPRLLIYRMSNLAS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSV QSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)

【0341】 在一些實施例中，人類化抗體亦包含人類重鏈恆定區及/或人類輕鏈恆定區。

8. 人類抗體

【0342】 在一些實施例中，本發明之抗體為人類抗體。人類抗體可藉由任何合適之方法來製備。非限制性示例性方法包括在包含人類免疫球蛋白基因座之基因轉殖小鼠中製備人類抗體。參見例如Jakobovits等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-55 (1993)；Jakobovits等人, Nature 362: 255-8 (1993)；onberg等人, Nature 368: 856-9 (1994)；及美國專利第5,545,807號；第6,713,610號；第6,673,986號；第6,162,963號；第5,545,807號；第6,300,129號；第6,255,458號；第5,877,397號；第5,874,299號；及第5,545,806號。

【0343】 非限制性示例性方法亦包括使用噬菌體展示文庫製備人類抗體。參見例如Hoogenboom等人, J. Mol. Biol. 227: 381-8 (1992)；Marks等人, J. Mol. Biol. 222: 581-97 (1991)；及PCT公開案第WO 99/10494號。

抗體恆定區

【0344】 在一些實施例中，本文所描述之人類化、嵌合或人類抗體包含一或多個人類恆定區。在一些實施例中，人類重鏈恆定區屬於選自IgA、IgG及IgD

之同型。在一些實施例中，人類輕鏈恆定區屬於選自κ及λ之同型。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG恆定區，例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些實施例中，抗體或Fc融合配偶體例如在IgG1恆定區中包含C237S突變。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG2重鏈恆定區。在一些此類實施例中，如美國專利第6,900,292號中所描述，IgG2恆定區包含P331S突變。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG4重鏈恆定區。在一些此類實施例中，本文所描述之抗體在人類IgG4恆定區中包含S241P突變。參見例如Angal等人Mol. Immunol. 30(1):105-108 (1993)。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG4恆定區及人類κ輕鏈。

【0345】　重鏈恆定區之選擇可決定抗體是否將在活體內具有效應功能。在一些實施例中，此類效應功能包括抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)，且可引起對與抗體結合之細胞之殺傷作用。典型地，包含人類IgG1或IgG3重鏈之抗體具有效應功能。

【0346】　在一些實施例中，效應功能為不需要的。舉例而言，在一些實施例中，在炎症病狀及/或自體免疫病症之治療中，效應功能可為不需要的。在一些此類實施例中，對人類IgG4或IgG2重鏈恆定區加以選擇或工程改造。在一些實施例中，IgG4恆定區包含S241P突變。

【0347】　本文所描述之抗體中之任一者可藉由任何合適之方法進行純化。此類方法包括但不限於使用親和力基質或疏水相互作用層析。合適之親和力配位體包括與抗體結合之抗原及/或抗原決定基，及結合抗體恆定區之配位體。舉例而言，蛋白質A、蛋白質G、蛋白質A/G或抗體親和管柱可用於結合恆定區及純化抗體。

【0348】　在一些實施例中，疏水性相互作用層析(HIC) (例如丁基或苯基管柱)亦用於純化一些多肽。許多純化多肽之方法為此項技術中已知的。

【0349】　或者，在一些實施例中，在無細胞系統中產生本文所描述之抗體。非限制性示例性無細胞系統描述於例如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)中。

9. 抗體海藻糖基化及非海藻糖基化

【0350】　本發明之一個態樣提供結合CXCR5之海藻糖基化及非海藻糖基化抗體及包含此類抗體之組合物以及此類抗體之用途，包括治療及醫藥用途。

【0351】　或者，本發明提供展現改變之效應功能的抗CXCR5抗體。在一些實施例中，改變之效應功能為增加之ADCC。在一些實施例中，抗體缺乏或含有可偵測地降低之水準(例如<10%、<5%、<2%)之海藻糖(亦即，其為非海藻糖基化的)。

【0352】　在一些實施例中，提供能夠形成結合CXCR5之抗體的非海藻糖基化抗體重鏈及輕鏈。在一些實施例中，提供包含一或多個特定互補決定區(CDR)之非海藻糖基化抗體、重鏈及輕鏈。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體具有改變之效應功能。在一些實施例中，相對於以其他方式相同之本發明之海藻糖基化抗CXCR5抗體，本發明之抗體具有增強之ADCC活性。

【0353】　L-海藻糖(或6-去氧-L-半乳糖)為一種單醣，其為動物中之一些N-鍵聯及O-鍵聯之聚醣及醣酯之組分(Becker及Lowe, *Glycobiology* 13:41R-51R, 2003，該參考文獻以引用之方式併入本文中)。典型地添加海藻糖作為對聚醣(包括連接至血型抗原、選擇素及抗體之聚醣)之末端修飾。海藻糖可藉由特定海藻糖基轉移酶經由α(1,2)-鍵聯、α(1,3)-鍵聯、α(1,4)-鍵聯及α(1,6)-鍵聯連接至聚醣。α(1,2)-海藻糖鍵聯典型地與H-血型抗原相關。α(1,3)-海藻糖鍵聯及α(1,4)-海藻糖鍵聯與LewisX抗原之修飾相關。α(1,6)-海藻糖鍵聯與N-鍵聯之GlcNAc分子相關，諸如抗體上之彼等N-鍵聯之GlcNAc分子。

【0354】 本發明之「非海藻糖基化」抗體包括缺乏海藻糖之抗體，例如在恆定區糖基化中缺乏海藻糖之IgG1或IgG3同型抗體。人類IgGl或IgG3之糖基化發生在Asn297處，因為核心海藻糖基化雙觸角複合物寡醣糖基化在達至2個Gal殘基之情況下終止。

【0355】 存在於IgG之CH2結構域中之複合物寡醣結構之主要類型或「醣型」描述於WO 99/22764 (以引用之方式併入本文中，參見第7頁)中。在此，G0係指其中不存在末端唾液酸(NeuAc)或Gal之雙觸角結構，G1係指具有一個Gal而沒有NeuAc之雙觸角結構，且G2係指具有兩個末端Gal而沒有NalAc之雙觸角結構。

【0356】 在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體在Asn297處缺乏海藻糖。此等結構視末端Gal殘基之量而定命名為G0、G1 (1,6或1,3)或G2聚醣殘基。參見例如Raju, BioProcess Int.1: 44-53 (2003)。抗體Fc之CHO型糖基化描述於例如Routier, Glycoconjugate J.14: 201-207 (1997)中。

【0357】 在一些實施例中，如本文中可互換使用之「非海藻糖基」或「非海藻糖基化」抗體係指已經糖工程改造從而缺乏核心海藻糖之抗體。在聚醣部分中具有降低之海藻糖含量之抗體對FcγRIIIa (CD16)具有增加之親和力，且因此，具有增強之活性依賴性細胞毒性(ADCC)活性。

【0358】 可使用POTELLIGENT® CHOK1SV細胞株(Lonza Biologics)產生非海藻糖基抗體，其缺乏負責海藻糖添加之基因(α1,6-海藻糖基轉移酶)的兩個等位基因。非海藻糖基或海藻糖減少之抗體亦可藉由以各種方式修改寡醣生物合成活性來產生。舉例而言，N-乙醯葡糖胺-轉移酶III (GnTIII)在製備細胞株之高爾基氏體中之過表現產生與抗體之Fc恆定區相關之二等分寡醣結構且抑制海藻糖基化。在此類表現系統中，GnTIII表現水準與非海藻糖基化IgG1醣型及所得增強之ADCC活性之產生有關。

【0359】 亦可藉由使用糖類似物(諸如但不限於如WO 2012/019165中所描述之海藻糖類似物)降低細胞培養物中之海藻糖基化。因此，可使用此項技術中熟知之多種方法產生非海藻糖基化或海藻糖減少之抗體。

【0360】 在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體對FcγRIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體對FcγRIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體對FcγRIIIA(F158)具有增強之親和力。

【0361】 「醣型」係指包含各種碳水化合物單元之鍵聯的複合物寡醣結構。此類結構描述於例如Essentials of Glycobiology Varki等編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999)中，該參考文獻亦提供標準糖生物學命名法之綜述。此類醣型包括但不限於G2、G1、G0、G-1及G-2 (參見例如國際專利公開案第WO 99/22764號)。

【0362】 「糖基化模式」定義為碳水化合物單元共價連接至蛋白質(例如醣型)以及醣型共價連接至蛋白質之肽骨架(更特定而言連接至免疫球蛋白)之位點的模式。

【0363】 在一些實施例中，在非糖修飾之CHO宿主細胞中重組表現之一批抗體中至少85%在Asn297處為海藻糖基化的。

【0364】 當提及包含複數個抗體之組合物時，若組合物中之抗體中不到約5%在至少一個Asn297處包含海藻糖，則將抗體視為非海藻糖基化的。

【0365】 在某些實施例中，非海藻糖基化之水準為約100%，換句話說，使用用於量測抗體之海藻糖基化的標準方法在任一重鏈Asn297醣型上均未偵測到海藻糖。

【0366】 量測海藻糖之方法包括此項技術中已知之任何方法，包括本文所描述之方法。在一些實施例中，在包含複數個非海藻糖基化抗體之組合物中海藻

糖為不可偵測的。在一些實施例中，非海藻糖基化抗體具有增強之ADCC活性。

【0367】　在一些實施例中，提供具有缺乏連接(直接或間接)至Fc區之海藻糖的碳水化合物結構之抗體(亦即非海藻糖基化抗體)。舉例而言，包含複數個此類抗體之組合物中海藻糖之量可為0-30%、0-20%、0-15%、1-10%或0-5%。

【0368】　在一些實施例中，包含複數個本發明之抗體之組合物包含>80%、85%、90%、95%、97%、99%或>99.5%非海藻糖基化抗體。在一些實施例中，抗體在偵測極限內為100%非海藻糖基化的(亦即，海藻糖為使用此項技術認可之用於偵測抗體(諸如本文所描述之抗體)中之海藻糖的方法在Asn297處不可偵測的/未偵測到的)。可藉由相對於連接至Asn 297之所有糖結構(例如複合物、雜合物及高甘露糖結構)之總和計算糖鏈內在Asn297處之海藻糖的平均量來確定海藻糖之量。

【0369】　在一些實施例中，海藻糖基化之水準不超過0.5%，此係基於測試方法之定量極限(LOQ)。因此，在一些實施例中，非海藻糖基化之水準大於或等於99.5%。

【0370】　N-鍵聯寡醣分析法可用於確定樣品中海藻糖基化、唾液酸化、甘露糖基化及末端半乳糖基化之水準。N-鍵聯寡醣法可用於評估N-鍵聯聚醣。簡單來說，使用肽-N-糖苷酶F使N-鍵聯聚醣自蛋白質酶促釋放。接著藉由螢光劑對聚醣進行衍生化且使用親水性相互作用液相層析及螢光偵側進行分析。接著將層析型態與參考材料進行比較。此方法及此項技術中已知之許多其他方法均可用於評估抗體之海藻糖基化程度，且可用於確定存在於本發明之抗體中之海藻糖基化的水準。

【0371】　偵測抗體中之海藻糖之非限制性示例性方法包括MALDI-TOF質譜法(參見例如WO 2008/077546)、所釋放之螢光標記寡醣之HPLC量測(參見例如

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))、所釋放之螢光標記寡醣之毛細管電泳量測(參見例如Ma等人, *Anal. Chem.*, 71: 5185-5192 (1999))及使用脈衝電流偵測來量測單醣組成之HPLC (參見例如Hardy等人, *Analytical Biochem.* 170: 54-62 (1988))。

【0372】 Asn297係指位於Fc區中約位置297 (Fc區殘基之EU編號)之天冬醯胺殘基；然而，Asn297亦可因抗體中之微小序列變異而位於位置297上游或下游約加上或減去3個胺基酸處，亦即，在位置294與300之間。在本文所描述之CXCR5抗體中，Asn297可見於序列基元QYNST中。

【0373】 海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能。參見例如US 2003/0157108及US 2004/0093621。與「非海藻糖基化」或「海藻糖缺陷型」抗體有關之出版物之實例包括：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等人, *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004) (全部以引用之方式併入本文中)。

【0374】 能夠產生非海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之Lec 13 CHO細胞(Ripka等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986))；US 2003/0157108 A1；及WO 2004/056312 (參見實例11)；及敲除細胞株，諸如缺乏功能性α-1,6-海藻糖基轉移酶基因FUT8之細胞株，例如敲除CHO細胞(參見例如Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda等人,

Biotechnol. Bioeng, 94(4):680-688 (2006)；及WO2003/085107)。

【0375】　在某些實施例中，本發明之抗體具有二等分寡醣，例如其中連接至抗體之Fc區的雙觸角寡醣由GlcNAc二等分。此類抗體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能。此類抗體之實例描述於例如WO 2003/011878；美國專利第6,602,684號；及US 2005/0123546中。

【0376】　在某些實施例中，本發明之抗體在連接至Fc區之寡醣中具有至少一個半乳糖殘基。此類抗體可具有改良之CDC功能。此類抗體描述於例如WO 1997/30087；WO 1998/58964；及WO 1999/22764 (全部以引用之方式併入本文中)中。

【0377】　在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體在存在人類效應細胞之情況下比包含海藻糖之對照/親本抗體更有效地介導ADCC。通常，可使用如本文所揭示之活體外ADCC分析來確定ADCC活性，但涵蓋其他用於確定ADCC活性之分析或方法(例如在動物模型中等)。

【0378】　在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體具有增強之活體外及/或活體內ADCC活性。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體具有增強之活體外ADCC活性。在一些實施例中，藉由本文所描述之方法來確定活體外ADCC活性。簡單來說，將抗CXCR5抗體或同型對照之連續稀釋液與來自健康人類供體或食蟹猴之外周血單核細胞(PBMC)一起孵育。在此分析中，PBMC為自然殺傷(NK)效應細胞及目標$CXCR5^+$ B及Tfh樣細胞之來源。使用流式細胞術來定量約20 h後剩餘之B及Tfh樣細胞的數目。藉由將抗原結合群體之細胞毒性百分比針對PF-06835375抗體濃度之對數進行繪圖來產生細胞毒性滴定曲線。使用GraphPad Prism (6.0版，GraphPad Software, Inc, San Diego, CA)非線性回歸曲線擬合及促效劑劑量-反應模型之S形對數根據以下等式來確定EC50值：

Log (促效劑)與反應-可變斜率(四個參數)

Y =底部+ (頂部-底部/(1+ 10^((LogEC$_{50}$ - X)*希爾斜率)

其中Y為細胞毒性之百分比，X為抗體濃度，頂部為對應於S形曲線之上部平台之最大Y值，底部為對應於S形曲線之下部平台之最小Y值(限定至0)，且LogEC50為曲線拐點處之抗體濃度之對數。

【0379】 在實驗中使用平均值及標準偏差(STDEV)概述EC50值。

【0380】 在一些實施例中，使用自扁桃體單核細胞分離之CD4+ T細胞且添加自PBMC分離之NK細胞類似地評估人類化mAb誘導來自人類扁桃體之真正Tfh細胞之ADCC的能力。

【0381】 在一些實施例中，表現CXCR5之Ba/F3細胞用作目標細胞。在一些實施例中，藉由使用CytoTox非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI)定量LDH釋放來確定細胞毒性。

【0382】 在一些實施例中，使用5% Triton X-100來確定最大溶解且在不存在抗體之情況下確定自發釋放。在一些實施例中，可使用下式來確定特異性溶解之百分比：(實驗-自發釋放)/(最大-自發釋放) x 100 = 特異性溶解%。

【0383】 在一些實施例中，在所測試之至少一種抗體濃度下，與使用相同量之海藻糖基化抗體之特異性溶解相比，具有增強之ADCC活性之非海藻糖基化抗CXCR5抗體產生大至少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個百分點之特異性溶解。

【0384】 在一些實施例中，與使用海藻糖基化抗體之特異性溶解相比，具有增強之ADCC活性之非海藻糖基化抗CXCR5抗體產生大至少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個百分點之特異性溶解，其中各抗體在0.01與1微克/毫升(microg/ml)之間的濃度下且目標細胞為表現CXCR5之Ba/F3細胞。

【0385】 在一些實施例中，在0.000005微克/毫升至5微克/毫升範圍內之濃度下對抗體進行測試。

【0386】 在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體對FcγRIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體對FcγRIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體對FcγRIIIA(F158)具有增強之親和力。在一些實施例中，抗體對FcγRIIIA之親和力使用表面電漿子共振及/或如下來確定，其參考FcγRIIIA (V158)進行描述，但其亦適合確定對FcγRIIIA (F158)之親和力。

【0387】 簡單來說，在一些實施例中，將海藻糖基化或非海藻糖基化抗CXCR5抗體捕獲於蛋白質A塗佈之右旋糖酐晶片上。以各種濃度注射FcγRIIIA (V158) (可購自例如R and D Systems)。海藻糖基化及非海藻糖基化抗CXCR5抗體之締合常數、解離常數及FcγRIIIA (V158)親和力可例如使用與表面電漿子共振系統一起提供之軟體(例如Biacore T200評估軟體1:1結合模型)來確定。

【0388】 在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體可對FcγRIIIA (諸如FcγRIIIA (V158)或FcγRIIIA (F158))具有增強之親和力，且可以比海藻糖基化抗CXCR5抗體大至少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倍之親和力結合至FcγRIIIA。

10. 編碼本發明之抗體之核酸分子

【0389】 本發明亦提供包含編碼本文所描述之抗體之一或多條鏈之聚核苷酸的核酸分子。在一些實施例中，核酸分子包含編碼本文所描述之抗體之重鏈或輕鏈的聚核苷酸。在一些實施例中，核酸分子包含編碼本文所描述之抗體之重鏈的聚核苷酸與編碼輕鏈之聚核苷酸兩者。在一些實施例中，第一核酸分子包含編碼重鏈之第一聚核苷酸且第二核酸分子包含編碼輕鏈之第二聚核苷酸。

【0390】 在一些此類實施例中，重鏈及輕鏈自一個核酸分子或自兩個單獨核酸分子表現為兩種單獨多肽。在一些實施例中，諸如當抗體為scFv時，單一聚核苷酸編碼包含鍵聯在一起之重鏈與輕鏈的單一多肽。

【0391】 在一些實施例中，編碼本文所描述之抗體之重鏈或輕鏈之聚核苷酸包含編碼前導序列之核苷酸序列，其在轉譯時定位於重鏈或輕鏈之N端。如上文所論述，前導序列可為天然重鏈或輕鏈前導序列，或可為另一異源前導序列。

【0392】 核酸分子可使用此項技術中習知之重組DNA技術來構築。在一些實施例中，核酸分子為適合在所選宿主細胞(諸如哺乳動物細胞)中表現之表現載體。

11. 載體

【0393】 提供包含編碼本文所描述之抗體之重鏈及/或輕鏈之聚核苷酸的載體。此類載體包括但不限於DNA載體、噬菌體載體、病毒載體、逆轉錄病毒載體等。在一些實施例中，載體包含編碼重鏈之第一聚核苷酸序列及編碼輕鏈之第二聚核苷酸序列。在一些實施例中，重鏈及輕鏈自載體表現為兩種單獨多肽。在一些實施例中，重鏈及輕鏈表現為單一多肽之一部分，諸如當抗體為scFv時。

【0394】 在一些實施例中，第一載體包含編碼重鏈之聚核苷酸且第二載體包含編碼輕鏈之聚核苷酸。在一些實施例中，將第一載體及第二載體以類似量(諸如類似莫耳量或類似質量)轉染至宿主細胞中。在一些實施例中，將莫耳比或質量比介於5:1與1:5之間的第一載體及第二載體轉染至宿主細胞中。在一些實施例中，使用質量比介於1:1與1:5之間的編碼重鏈之載體與編碼輕鏈之載體。在一些實施例中，使用質量比為1:2之編碼重鏈之載體與編碼輕鏈之載體。

【0395】 在一些實施例中，選擇針對多肽在CHO或CHO源性細胞中或NSO細

胞中之表現優化的載體。示例性此類載體描述於例如Running Deer等人, Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004)中。在一些實施例中，載體經選擇用於本發明抗體在包括人類之動物中之活體內表現。在一些此類實施例中，多肽之表現受以組織特異性方式發揮功能之啟動子的控制。舉例而言，肝臟特異性啟動子描述於例如PCT公開案第WO 2006/076288號中。

12. 宿主細胞

【0396】 本發明之另一態樣提供一種宿主細胞，該宿主細胞包含編碼本發明之抗CXCR5抗體中之任一者的核酸分子及/或包含該核酸分子之載體。

【0397】 在各個實施例中，本文所描述之抗體之重鏈及/或輕鏈可在原核細胞，諸如細菌細胞中；或真核細胞，諸如真菌細胞(諸如酵母)、植物細胞、昆蟲細胞及哺乳動物細胞中表現。此類表現可例如根據此項技術中已知之程序來進行。

【0398】 可用於表現多肽之示例性真核細胞包括但不限於COS細胞，包括COS 7細胞；293細胞，包括293-6E細胞；CHO細胞，包括CHO-S及DG44細胞；PER.C6®細胞(Crucell)；及NSO細胞。

【0399】 在某些實施例中，細胞為哺乳動物細胞。在某些實施例中，宿主細胞為CHO細胞、COS細胞、HEK-293細胞、NS0細胞、PER.C6®細胞或Sp2.0細胞。在某些實施例中，宿主細胞缺乏功能性α-1,6-海藻糖基轉移酶(FUT8)。在某些實施例中，宿主細胞不表現功能性α-1,6-海藻糖基轉移酶酶。在某些實施例中，細胞缺乏編碼功能性酶之FUT8基因。在某些實施例中，宿主細胞缺乏編碼功能性FUT8基因之基因。在某些實施例中，宿主細胞為Potelligent® CHOK1SV細胞，或Lec13 CHO細胞。在某些實施例中，宿主細胞為Potelligent® CHOK1SV細胞。

【0400】 在一些實施例中，本文所描述之抗體之重鏈及/或輕鏈可在酵母中表

現。參見例如美國公開案第US 2006/0270045 A1號。在一些實施例中，基於對CXCR5抗體之重鏈及/或輕鏈進行所需轉譯後修飾之能力選擇特定真核宿主細胞。舉例而言，在一些實施例中，CHO細胞產生比293細胞中所產生之相同多肽相比具有更高水準之唾液酸化的多肽。

【0401】 將一或多種核酸引入所需宿主細胞中可藉由任何方法來實現，包括但不限於磷酸鈣轉染、DEAE-右旋糖酐介導之轉染、陽離子脂質介導之轉染、電穿孔、轉導、感染等，非限制性示例性方法描述於例如Sambrook等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第3版Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)中。可根據任何合適之方法將核酸在所需宿主細胞中瞬時或穩定轉染。

【0402】 在一些實施例中，可在動物中活體內產生一或多種多肽，該動物已根據任何合適之方法工程改造或用一或多個編碼多肽之核酸分子轉染。

【0403】 因此，本發明之另一相關態樣提供一種製備抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括將本文所描述之本發明之宿主細胞(例如包含本發明之抗體或其功能性抗原結合片段中之任一者之聚核苷酸編碼序列的彼等宿主細胞)在其中該抗體或抗原結合片段由該宿主細胞表現之條件下進行培養。

【0404】 在某些實施例中，該方法進一步包括分離該抗體或其抗原結合片段。

【0405】 在相關態樣中，本發明提供一種製備非海藻糖基化抗CXCR5抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括培養包含本發明之核酸分子或本發明之載體的宿主細胞，其中宿主細胞缺乏功能性FUT8。

【0406】 在某些實施例中，宿主細胞為Potelligent® CHOK1SV細胞。

【0407】 本發明之另一相關態樣提供一種使用本發明之方法產生之分離之抗體或其抗原結合片段。

【0408】 在某些實施例中，本發明之分離之抗體或其抗原結合片段為非海藻

糖基化的。

【0409】　在某些實施例中，與海藻糖基化之以其他方式相同之抗體或其抗原結合片段相比，非海藻糖基化抗體或其抗原結合片段展現增強之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

【0410】　在某些實施例中，非海藻糖基化抗體或其抗原結合片段展現比海藻糖基化之以其他方式相同之抗體或其抗原結合片段大約2倍、約5倍、約7倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約110倍、約120倍、約130倍、約140倍及約143倍的ADCC。

【0411】　本發明之另一相關態樣提供一種醫藥組合物，該醫藥組合物包含本發明之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的。

實例

實例1　嵌合抗CXCR5單株抗體之鑑定及初步表徵

【0412】　使用不同設計進行三個免疫週期，此產生總共185個候選鼠單株抗體，其中54個經證實為CXCR5之結合劑。經驗證之結合劑中有六個具有高結合親和力，經表徵為MFI>50%之基準抗體信號，及>80%之陽性細胞。

【0413】　接著基於鼠抗體之可變(VH及VL)區及人類IgG1之hIgG1支架/恆定區產生嵌合單株抗體。以與使用同型對照獲得之百分比相比>1個對數之陽性細胞之百分比的形式對特異性抗體進行表徵。

使用活體外分析選擇候選嵌合抗體

【0414】　接著對嵌合抗體進行一系列活體外表徵將此等抗體按優先順序列出。特定而言，六種強結合劑之表徵係基於與在表現相關靶標之細胞上之結合、特異性分析及藉由流式細胞術進行之交叉反應性分析不同之關鍵活體外分析。建立若干二階分析以基於對B細胞遷移之功能效應、酶促細胞內促效活性

及受體內化對強結合劑進行排列。最重要的是，接著在抗體依賴性細胞細胞毒性(ADCC)報告子分析中對強候選物進行表徵，因為ADCC為強候選抗體之所需作用模式。ADCC報告子分析之讀數為來自驅動螢光蟲螢光素酶表現之NFAT反應元件之發光信號。

【0415】 為測試對CXCR5之結合能力，在結合分析中使用表現目標抗原hCXCR5之黏附穩定細胞株對六種嵌合單株抗體進行測試。結果表明，所有六種嵌合抗體均以不同結合特性結合至表現目標抗原之細胞。其中，與HFB2-1-hG1及HFB2-2-hG1相比，嵌合抗體HFB2-3-hG1、HFB2-4-hG1、HFB2-5-hG1及HFB2-6-hG1顯示更高之結合能力。除一種外所有嵌合抗體均顯示亞nM EC50值。參見圖5。

【0416】 接下來，交叉反應性結合評估表明，與分析中所包括之陽性對照相比，嵌合單株抗體均不與猴或鼠CXCR5異種同源物交叉反應。參見圖6A。另外，抗hCXCR5嵌合抗體均不結合至hCXCR5異種同源物hCXCR3，因此證實其特異性。參見圖6B。

【0417】 由於目標抗原CXCR5為參與趨化性之GPCR，故進行實驗以證實本發明抗體抑制活體外B細胞遷移之能力。作為特異性抗體排列分析之一，B細胞遷移分析使用表現CXCR5目標抗原之M300.19懸浮細胞來測試所有抗體候選物以及基準/對照抗體。如下計算此分析中之抑制程度：抑制%= (1-遷移%/無抗體情況下之遷移%之平均值) * 100。

【0418】 為進行分析，製備一式三份之10 nM至0.1 nM之三種抗體稀釋液，用於在37°C下進行6-h孵育。在Cytoflex上對細胞進行計數，對表現CXCR5目標抗原之M300.19細胞重複兩次(n=2)。

【0419】 結果表明，候選抗體顯示不同抑制特性，且至少其中一些能夠抑制配位體(CXCL13)誘導之趨化性。抑制此類趨化性最有效之抗體候選物為嵌合抗

體HFB2-4-hG1，其在約1 nM下達至100%抑制。參見圖7。

【0420】　另外，在cAMP分析中對強結合劑進行測試以證實其促效/拮抗特性。評估候選抗體在由CXCL13配位體活化後是否可阻斷細胞內cAMP水準。分析係基於以下原理：可量測之化學發光信號與細胞中之cAMP的量成正比。在用Gαi路徑中之配位體活化後，預期cAMP降低。化學發光信號增加與cAMP水準反相關。

【0421】　cAMP分析顯示6種候選抗體之不同功能特性。特定而言，與其他4種候選抗體相比，HFB2-4-hG1及HFB2-5高效地阻斷CXCL13誘導之細胞內cAMP信號傳導，且兩者均優於基準抗體。圖8。

【0422】　歸因於本發明抗體之所需目標產物型態，亦在ADCC報告子生物分析中對六種強嵌合結合劑進行測試。

【0423】　ADCC為使帶有之Fc受體效應細胞可識別及殺死抗體(Ab)塗佈之在表面表現抗原之目標細胞的免疫機制。ADCC由抗原結合之Ab與免疫效應細胞表面之Fc受體CD16A之間的交聯觸發。此等相互作用誘導細胞內鈣濃度增加、鈣調神經磷酸酶/鈣調素介導之NFAT去磷酸化，從而允許其核轉位及結合至ADCC相關基因之啟動子區。最終，效應細胞釋放殺死目標細胞之細胞毒性顆粒。在報告子生物分析中，將效應細胞設計為效應報告細胞，因為此等細胞在融合至多個NFAT反應元件之最小啟動子控制下穩定表現報告基因，諸如螢光素酶報告基因。在此系統中，將ADCC誘導量測為在由抗原結合之抗體活化CD16A信號傳導後且在添加適當偵測試劑後由螢光素酶產生之生物發光信號。

【0424】　具有已知作用模式之抗CD20抗體在此分析中用作陽性對照。雖然不同候選抗體顯示明顯不同之ADCC能力，但HFB2-4-hG1顯示在CD16接合中具有最佳效能。圖9A。

【0425】　概括地說，從54種特異性抗CXCR5抗體中鑑定了六種單位數萘莫耳

親和力嵌合結合劑(亦即，HFB2-1-hG1、HFB2-2-hG1、HFB2-3-hG1、HFB2-4-hG1、HFB2-5-hG1、HFB2-6-hG1)。此六種強結合劑之表徵顯示各種特性。均不與CXCR5之鼠或猴異種同源物交叉反應。其全部為靶標特異性的，且不識別最靠近之同源物CXCR3。

HFB2-4hG1之藥物動力學(PK)評估

【0426】 基於如cAMP、趨化性及ADCC之三種不同功能測試，HFB2-4hG1似乎為最有前途且有效之候選物，且選擇用於PK評估。參見小鼠中HFB2-4hG1嵌合抗體之有利PK型態(圖3)。

【0427】 在8-10週齡野生型(wt) C57BL/6J小鼠中進行HFB2-4-hG1之藥物動力學(PK)研究。通過尾部靜脈以如1mg/kg及10 mg/kg之兩種不同濃度靜脈內投與HFB2-4-hG1。在8個不同時間點(在1h、2h、4h、8h、24h、48h、72h及7天時)自各小鼠收集約50 μL之血漿樣品。使用內部優化之標準方案藉由ELISA定量各樣品中之人類IgG水準。結果表明HFB2-4-hG1展現有利PK型態($t_{1/2}$ = 158 h)。

DE突變對HFB2-4hG1之ADCC活性之影響

【0428】 鑒於HFB2-4hG1抗體在其他5種強hCXCR5結合劑中顯示最佳CD16接合之事實，選擇在DE支架(S239D/I332E)中產生HFB2-4hG1抗體以增強ADCC活性。在包括抗CD20陽性對照抗體之ADCC報告子生物分析中對HFB2-4-hG1與HFB2-4-hG1DE抗體兩者進行測試。正如所料，結果清楚地證實，HFB2-4誘導比對照抗CD20抗體更高程度之CD16接合，且表明DE支架進一步增加抗體之ADCC特性(在$E_{最大}$與EC_{50}兩者中)，並且活性比陽性對照抗體抗CD20更佳。圖9B。

【0429】 接下來，藉由使用自表現靶標之健康供體外周血單核細胞(PBMC)分離之原代NK細胞(效應細胞)及Raji細胞(目標細胞)測試HFB2-4hG1DE之ADCC活性。資料表明HFB2-4hG1DE介導原代NK細胞以0.76 pM EC50值溶解

Raji細胞，此比利妥昔單抗陽性對照抗體更有效。參見圖9C。

【0430】　另外，藉由使用表現靶標之原代NK細胞(效應細胞)及原代B細胞(目標細胞)進一步測試HFB2-4hG1DE之ADCC活性；兩種原代細胞群體分離自不同健康供體之PBMC。HFB2-4hG1DE誘導原代NK細胞以0.44 fM EC50值溶解外周B細胞，此亦比利妥昔單抗陽性對照抗體更有效。參見圖9D。亦進行類似實驗以檢驗HFB2-4hG1DE關於溶解人類原代T細胞之ADCC活性，且發現HFB2-4hG1DE亦誘導hCXCR5+ CD4+原代T細胞之強NK介導之溶解。參見圖9E。

【0431】　進行另一類似實驗以檢驗非海藻糖基化HFB2-4hG1 (無DE突變)單株抗體(AfuHFB2-4hG1)關於溶解人類原代T細胞之ADCC活性。發現與無抗體對照(單獨CD4+細胞，在存在或不存在NK細胞之情況下)相比，AfuHFB2-4hG1亦在極廣泛範圍之抗體濃度內以劑量依賴性方式誘導hCXCR5+ CD4+原代T細胞之強NK介導之溶解(參見圖9F)，而利妥昔單抗(hG1) (其靶向表現CD20表面抗原之B細胞)及同型對照抗體MGO53-hG1在廣泛範圍之抗體濃度內基本上沒有影響。參見圖9F。

HFB2-4hG1之活體內抗腫瘤活性

【0432】　在基於癌細胞株(Raji及Daudi細胞)獲得結合資料之後，僅使用基於Raji細胞之腫瘤模型在CB17-SCID免疫缺陷小鼠中進行活體內研究。簡單來說，在6-8週齡CB-17 SCID小鼠中皮下接種Raji細胞。研究中包括四個不同組；同型對照(MGO53-hG1)、PBS對照、陽性對照(HFB2-利妥昔單抗-hG1)及先導候選物組(HFB2-4-hG1)。處理由每三天以10 mg/kg腹膜內(i.p.)投與抗體中之一者持續21天構成。每三天對各小鼠之腫瘤生長及體重進行量測。

【0433】　在類似於利妥昔單抗對照之Raji異種移植模型中，投與HFB2-4hG1 (10 mg/kg，BIWx7，腹膜內)產生有效抗腫瘤活性。參見圖16。

【0434】　概括地說，HFB2-4 (hG1及hG1DE)嵌合抗hCXCR5抗體顯示與表現

CXCR5之細胞的強結合，有效抑制配位體誘導之遷移及信號傳導，在小鼠中展現有利PK型態，在Raji異種移植鼠模型研究中顯示抗腫瘤活性，介導關於原代NK細胞針對Raji B細胞淋巴瘤細胞株與原代B細胞兩者之強ADCC。基於活體外及*e*中產生之資料，證實先導抗體系列HFB2-4 (hG1及hG1DE)為最適合於人類化之候選物。

實例2　人類化抗體之表徵

【0435】　基於HFB2-4-hG1，使用CDR接枝，藉由選擇來自鼠抗體序列之負責抗體之抗原識別的互補決定區(CDR)且將其接枝至hIgG1之人類構架區(FR)中來產生人類化抗hCXCR5單株抗體。

【0436】　總體來說，使用CDR接枝產生總共25種人類化變異體。與親本嵌合抗體相比，彼等變異體大部分保留其物理化學活性(對靶標之親和力、穩定性、溶解度)及/或生物活性(阻斷或刺激靶標、ADCC)。

【0437】　簡單來說，12種基於HFB2-4之人類化抗體變異體(亦即，HFB2-4hz)中的10種顯示與親本嵌合抗體HFB2-4類似之與hCXCR5之結合。此外，12種HFB2-4hz變異體中的9種阻斷cAMP信號傳導，該等結果與結合結果一致。此外，觀測到由人類化變異體引起之有效趨化性抑制，其中HFB2-4hz12為最有效的(在0.1 nM下約100%)。在後續實驗中，在HFB2-4Hz9與HFB2-4Hz12之間亦發現類似效能。

【0438】　遵循用於嵌合單株抗體之活體外表徵的相同程序(參見實例1)對人類化抗hCXCR5單株抗體進一步表徵。除關鍵及2階表徵分析外，人類化變異體表徵中亦包括可開發性評估測試。

抗體內化之評估

【0439】　藉由Incucyte抗體內化及pHAb活性染料(Promega)分析對由表現相關抗原(例如CXCR5)之細胞引起之抗體內化進行評估。

【0440】 抗原介導之抗體內化在若干基於抗體之治療劑中起重要作用。視所需作用模式而定，可能需要具有在結合細胞表面抗原後優先內化至目標細胞中之抗體(諸如高毒性藥物經由抗體藥物結合物(ADC)遞送至癌細胞及癌細胞之表面受體(亦即EGFR)之移除或降解)，或優先保持結合至細胞表面之抗體(諸如針對免疫細胞殺傷作用(亦即ADCC或ADCP)對腫瘤細胞進行鑑定)。另外，量測及優化對抗體之功能反應(諸如抗體清除)為極其重要的。舉例而言，胞飲作用為抗體之主要消除途徑之一，在抗體開發期間需要針對定性藥物動力學量測進行抗體優化。由於各方法需要一系列抗體特徵，例如以實現維持在細胞表面以便鑑定腫瘤細胞或當遞送ADC時快速內化，重要的是理解抗體候選物之攝入型態及清除以便獲得最佳抗體工程改造及內化特徵。

【0441】 IncuCyte® FabFluor抗體標記試劑為結合至pH敏感性螢光探針之Fc區靶向Fab片段。此等試劑使所有同型匹配之含有Fc之測試抗體能夠使用通用一步無洗滌標記方案。在pH 7.0下，Fab-Ab複合物幾乎沒有螢光。當將標記抗體添加至細胞中時，在Fab-Ab複合物內化且經由酸性(pH 4.5-5.5)溶酶體及內體加工時觀測到螢光信號。內化之整個時間過程可目視觀察且使用實時活細胞分析進行自動定量。

【0442】 pHAb染料為pH值感測染料，其在pH ＞7下具有極低之螢光，且隨溶液之pH值變為酸性，螢光顯著增加。pHAb染料具有532 nm之最大激發(Ex)波長及560 nm之最大發射(Em)波長。pHAb染料經設計特定而言用於標記抗體。舉例而言，pHAb胺活性染料(a)具有與在抗體上之離胺酸胺基酸上可獲得之一級胺反應的丁二醯亞胺基酯基。

【0443】 自兩種分析獲得之結果表明，與陽性對照(CD71)抗體相比，HFB2-4hz9-hG1DE與HFB2-4hz12-hG1DE均不內化。圖10A-10B。

人類化變異體之ADCC活性

【0444】 人類化抗體中之兩者(HFB2-4hz9-hG1DE及HFB2-4hz12-hG1DE)顯示與親本嵌合抗體HFB2-4-hG1DE相同程度之有效ADCC活性。正如所料，與人類化變異體相比，hG1支架中之HFB2-4及基準抗體具有更低之ADCC活性。如先前在HFB2-4hz9-hG1DE及HFB2-4hz12-hG1DE情況下所顯示，兩種其他人類化變異體(HFB2-4hz14-hG1DE及HFB2-4hz15-hG1DE)之結果亦顯示高效接合CD16從而誘導ADCC。參見圖11A及11B。

【0445】 為優化涵蓋基於休格蘭症候群患者樣品之ADCC活性之分析條件，使用自來自健康供體之外周血單核細胞(PBMC)分離之原代B細胞。特定而言，基於流式細胞術分析針對原代B細胞上之目標抗原CXCR5表現對若干健康供體進行篩查。使用具有高原代B細胞CXCR5表現之供體對ADCC報告子生物分析之條件(如效應子靶標比率)進行優化。Jurkat細胞(Promega)用作報告效應細胞，用於量測由其由CD16介導之歸因於ADCC之信號傳導活化之報告螢光素酶發射之螢光信號。

【0446】 結果表明，親本嵌合抗體以及其人類化變異體針對原代B細胞展現ADCC活性。參見圖13，該圖顯示人類化變異體中之一者(HFB2-4Hz12-hG1DE)之ADCC報告子分析之結果。人類化抗體針對表現CXCR5之原代B細胞展現ADCC效應。

人類化變異體之活體內抗腫瘤活性

【0447】 在活體內靜脈內Raji異種移植模型中評估HFB2-4hz42 (在小鼠IgG2a模式中)誘導抗腫瘤活性之能力。用Raji細胞接種每組8只小鼠，且將小鼠用HFB2-4hz42或小鼠IgG2a模式中之同型或作為陽性對照之利妥昔單抗(hG1模式)處理。另外，亦包括未經處理之組原初小鼠。每三天為小鼠腹膜內注射10mg/kg之測試抗體持續15天。如以下結果表格中所示，與用同型對照抗體處理之小鼠相比，投與HFB2-4hz42mIgG2使得存活顯著增加。

組	中值 存活	P值(與G1比較)	P值 (與G3比較)
G1，MGO53-mG2a， 10 mpk	22	-	-
G2，HFB2-4hz42-mIgG2a，10 mpk	40	＜0.0001****	0.0023**
G3，利妥昔單抗(hG1) 10 mpk	全部存活	＜0.0001****	-

實例3　人類化抗體之癌症靶標之鑑定

【0448】　在活體內功效模型選擇之前，選擇8種不同癌細胞株進行篩查以證實活體外目標CXCR5表現。

【0449】　藉由流式細胞術進行之結合評估證實HFB2-4hz12-hG1DE以類似於利妥昔單抗(用於治療非霍奇金氏淋巴瘤及慢性淋巴細胞性白血病之抗CD20單株抗體)之程度結合至Raji及Daudi細胞，但不大量結合至任何其他所選癌細胞株。參見圖14。

【0450】　接著在不同效應子:靶標比率(1:1及3:1)下，基於B細胞淋巴瘤細胞株(Raji及Daudi細胞)對此人類化抗體之ADCC活性進行評估。如前所述，在ADCC報告子分析使用Raji細胞使用已經設定之實驗條件進行嵌合及人類化變異體抗體之活體外表徵，且在ADCC報告子分析中僅測試Daudi細胞。資料表明HFB2-4hz12-hG1DE針對Daudi細胞具有大於由對照抗CD20抗體展現之ADCC活性的ADCC活性。參見圖15。

實例4　對休格蘭患者之B細胞的ADCC活性

【0451】　為證實本發明抗體在治療休格蘭症候群(SS)中之潛在功效，使用ADCC報告子分析來表明本發明之人類化單株抗體HFB2-4hz12hIgDE可高效地接合CD16，從而誘導對自獲自經處理之SS患者之冷凍材料分離的B細胞之ADCC效應。參見圖17。

【0452】　特定而言，自獲自2個先前經處理之SS患者之冷凍PBMC樣品分離B細胞，且用於如上文所描述之ADCC報告子分析。實驗中使用各抗體之11 nM-

0.005nM之三倍連續稀釋液。結果表明HFB2-4hz12hIgDE高效地接合CD16從而誘導ADCC。

【0453】 其他資料表明，HFB2-4hz12-hG1降低SS患者之樣品中記憶B細胞群體之百分比。參見圖18。

【0454】 如先前所描述，亦基於來自SS患者之B細胞使用ADCC報告子分析(Promega)對HFB2-4hG1DE進行測試。觀測到與呈hG1模式之利妥昔單抗相比，HFB2-4hG1DE具有更高之CD16接合且誘導強得多之ADCC讀數。(圖9B-9C)。

【0455】 總體來說，迄今為止獲得之結果表明人類化抗hCXCR5 IgG1抗體對人類CXCR5具有nM親和力，且在表現hCXCR5之B細胞、休格蘭症候群(SS)患者之生髮中心中之潛在濾泡輔助T細胞/B細胞中誘導ADCC。

實例5 其他系列之人類化變化之產生及表徵

【0456】 藉由將不同可變重鏈及可變輕鏈組合，基於HFB2-4hG1 (HFB2-4hz-hG1)產生36種其他人類化變異體。使用類似於實例1或如實例1中所描述之方法對此等抗體進行表徵。

【0457】 在兩種不同濃度1 nM及0.1 nM下在對Raji細胞之結合分析中測試此36種人類化變異體之結合特性。36種人類化變異體全部對Raji細胞展現顯著結合型態。參見圖19A及19B。

【0458】 在8週至10週齡野生型C57BL/6J小鼠中對排名最靠前的九種人類化變異體進行藥物動力學研究(各人類化變異體n=3)。以10 mg/kg之濃度以單次劑量由尾部靜脈內(i.v.)投與各人類化變異體mAb。在如1h、24h、96h，包括時間0時之處理前劑量之四個不同時間點，自各小鼠收集50 μL之血漿樣品。使用內部優化之標準方案藉由ELISA定量各樣品中之人類IgG水準。九種人類化變異體全部展現與親本HFB2-4hG1類似之PK型態。參見圖20。選擇表2中所列之排名最靠前的六種人類化變異體用於進一步活體外及活體內表徵。

表2. 基於HFB2-4hG1之其他系列之中的排名最靠前的六種人類化變異體

Ab名稱		重鏈名稱	輕鏈名稱	VH人類化水準%	VL人類化水準%	PI
親本抗體	HFB2-4hG1	VH3	VL4			
HFB2-4hz37hG1	HFB2-VH3VL6	pHFB-HFB2-**VH3**	pHFB-HFB2-**VL6**	87.40%	80.60%	8.65
HFB2-4hz38hG1	HFB2-VH3VL7	pHFB-HFB2-**VH3**	pHFB-HFB2-**VL7**		83%	8.5
HFB2-4hz39hG1	HFB2-VH6VL6	pHFB-HFB2-**VH6**	pHFB-HFB2-**VL6**	85.40%	81%	8.76
HFB2-4hz41hG1	HFB2-VH8VL7	pHFB-HFB2-**VH8**	pHFB-HFB2-**VL7**	78,10%	83%	8.5
HFB2-4hz42hG1	HFB2-VH10VL6	pHFB-HFB2-**VH10**	pHFB-HFB2-**VL6**	88.50%	81%	8.71
HFB2-4hz45hG1	HFB2-VH11VL7	pHFB-HFB2-**VH11**	pHFB-HFB2-**VL7**	78,10%	83%	8.5

【0459】 排名最靠前的6種HFB2-4hz-hG1變異體全部展現類似之對Raji細胞之結合型態及在報告子系統中接合CD16之ADCC活性。參見圖21。

【0460】 值得注意的是，在排名最靠前的6種候選物中，HFB2-4hz41hG1及HFB2-4hz45hG1展現較低之人類化水準。因此，將此兩種變異體排除在列表外，留下4種變異體用於進一步表徵。

【0461】 為增強最佳之四種人類化變異體之ADCC活性，以hG1DE模式產生此等變異體。針對與表現目標CXCR5之黏附細胞DX002-CHOK1之結合對呈hG1DE模式之排名最靠前的四種人類化變異體進行測試。人類化變異體顯示類似於HFB2-4hG1DE親本抗體之效能。參見圖22。

【0462】 為研究DE模式是否影響抗體之藥物動力學(PK)型態，在8週至10週齡野生型C57BL/6J小鼠中在hG1及hG1DE支架中之人類化變異體中進行snapshot PK研究(各人類化變異體n=1)。以10 mg/kg之濃度以單次劑量由尾部靜脈內投與各人類化變異體抗體。在如1h、24h、96h，包括時間0時之處理前劑量之四個不同時間點自各小鼠收集50 μL之血漿樣品。使用內部優化之標準方案藉由ELISA定量各樣品中之人類IgG水準。人類化變異體展現類似於具有相同模式之親本抗體之PK型態。

概述

【0463】 總體來說，產生了36種人類化變異體且進行了測試。保留HFB2-4hz37hG1、HFB2-4hz38hG1、HFB2-4hz39hG1及HFB2-4hz42hG1用於鑑定先導候選抗體。四種人類化變異體具有與具有類似活體外結合及生物特性之HFB2-4hG1-DE非常類似之型態。

【0464】 然而，在PK分析中，HFB2-4hz39hG1具有較短之半衰期。關於可開發性型態，HFB2-4hz42hG1表現得稍微更好。關於cIEF型態，HFB2-4hz42hG1及HFB2-4hz37hG1顯示最合適之型態。參見表3。

【0465】　因此，選擇HFB2-4hz42hG1及HFB2-4hz37hG1作為先導及後備抗體且將針對活體內功效研究進行進一步測試。其VH及VL鏈之序列顯示於表4中。

表3. 呈hG1DE形式之排名最靠前的四種人類化變異體之表徵的概述

					可開發性評估研究									
					Snapshot PK型態					熱處理			
Ab名稱	**VH人類化%**	**VL人類化%**	**結合至DX002，EC50 (nM)**	**CD16接合，EC50 (nM)**	**1h ug/ml**	**24h ug/ml**	**96h ug/ml**	**調配物**	**cIEF**	**25°C**	**40°C**	**在低pH值下之應力(6 h)**	**冷凍/解凍(5x)**
HFB2-4hG1				**0.010**	146	52	43						
HFB2-4hG1DE			0,186		138	39	20						
HFB2-4hz37hG1DE	87,4%	80,6%	0,099	0.010	151	30	14	乙酸鹽	9,10 +++	穩定	降解	降解	穩定
HFB2-4hz38hG1DE		83,0%	0,106	0.010	161	37	17	乙酸鹽	8,80 ++	降解	降解	降解	穩定
HFB2-4hz39hG1DE	85,4%	81,0%	0,260	0.011	90	20	7	乙酸鹽	9,35 ++	穩定	降解	降解	穩定
HFB2-4hz42hG1DE	88,5%	81,0%	0,171	0.009	126	37	16	乙酸鹽	9,15 +++	穩定	降解	穩定	穩定
			類似		**Hz38、Hz42、Hz37**					**Hz37、Hz39、Hz42**		**Hz42**	**類似**

表4. 來自基於HFB2-4hG1之其他系列之抗體之先導抗體的VH及VL序列

	Ab名稱	HC名稱	LC名稱	可變HC胺基酸	可變LC胺基酸
	HFB2-4hG1(VH+VL)			QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATYYCARVVYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGKAPKLLIYRMSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 111)
HFB2-4hz37hG1	HFB2-VH3VL6	pHFB-HFB2-**VH3**	pHFB-HFB2-**VL6**	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)
HFB2-4hz42hG1	HFB2-VH10VL6	pHFB-HFB2-**VH10**	pHFB-HFB2-**VL6**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 113)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)

*CDR序列加雙下劃線。

實例6　非海藻糖基化抗CXCR5抗體之產生及表徵

【0466】　產生用於增加與FcγRIIIa之結合且增強抗體效應功能之HFB2-4hG1及HFB2-4hz42-hG1之非海藻糖基化模式，用於使用類似於先前所描述之分析進行測試。結果概述如下。

【0467】　非海藻糖基化HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)及HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)以亞nM親合力結合至DX002細胞上之人類CXCR5且展示彼此類似之結合型態。參見圖24A。

【0468】　藉由ADCC報告子分析確定之CD16接合亦表明afu-HFB2-4hz42-hG1展示類似於afu-HFB2-4hG1親本抗體之接合CD16之效能。參見圖24B。

【0469】　另外，NK細胞通過由afu-HFB2-4hz42-hG1誘導之ADCC活體外殺死Raji細胞(資料未顯示)及自健康供體分離之B細胞(圖25)類似於基準抗體。關於表現CXCR5之T濾泡輔助細胞(Tfh)之ADCC殺傷作用的初始資料亦表明afu-HFB2-4hz42-hG1亦可誘導NK介導之自人類分離之CD4+CXCR5+原代T細胞之溶解(資料未顯示)。

【0470】　使用非海藻糖基化抗體檢驗NK對來自SS患者之B細胞之殺傷作用。如圖26中所示，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1以類似於基準抗體之程度誘導B細胞溶解。

【0471】　此外，針對補體依賴性細胞毒性(CDC)對非海藻糖基化抗體進行測試。使用已知具有CDC活性之利妥昔單抗(hIgG1模式)作為陽性對照。使用血清來提供實驗中補體系統之組分。利妥昔單抗在100 nM下達至約70-80%細胞溶解，但在非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1及非海藻糖基化HFB2-4hG1中未觀測到CDC活性。參見圖27A-27B。

【0472】　在野生型小鼠及食蟹猴中檢驗非海藻糖基化抗體之藥物動力學。在野生型C57BL/6J小鼠中，以10 mg/kg劑量以單次劑量由尾部靜脈注射非海藻糖

基化HFB2-4hz42-hG1、HFB2-4hG1及基準抗體，且在注射後0.5、6、24、96及168小時收集血漿以測定抗體濃度。afu-HFB2-4hz42-hG1之半衰期為114小時，PK型態類似於親本及基準抗體。參見圖28A。

【0473】 在食蟹猴(1雄性、2雌性)中，靜脈內輸注1mg/kg之單次劑量之抗體，且在注射之後2週期間對血液中之抗體濃度進行測定。在所測試之猴中，afu-HFB2-4hz42-hG1具有3-6.5天之半衰期。參見圖28B。

【0474】 使非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1經受多個穩定性測試：在25℃及40℃下熱處理長達30天，在3.5之低pH值下經受應力長達6小時，及多達5個冷凍/解凍循環。結果表明，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1在此等測試條件下總體上為穩定的(資料未顯示)。

【0475】 總體來說，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1針對來自健康供體與SS患者之原代B細胞類似於親本抗體在pM濃度下展現極大之結合及活體外ADCC活性，不誘導補體依賴性細胞毒性，展示有利藥物動力學型態及高穩定性。因此，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1具有極大之在臨床治療中使用之潛能。

參考文獻

【0476】 本文論述之所有參考文獻以引用之方式併入本文中。

Förster R, Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production, J Exp Med. 2000.

Allen CD, Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5, Nat Immunol. 2004.

Förster R, A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen, Cell, 1996.

Reif K, Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position, Nature, 2002.

Aqrawi L, Diminished CXCR5 expression in peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome may relate to both genotype and salivary gland homing. Clinic Exp Immunol, 2018.

Szabo K, The Histopathology of Labial Salivary Glands in Primary Sjögren's Syndrome: Focusing on Follicular Helper T Cells in the Inflammatory Infiltrates, Mediators Inflamm. 2014.

Kramer JM , CXCL13 is elevated in Sjögren's syndrome in mice and humans and is implicated in disease pathogenesis, J Leukoc Biol, 2013.

Sharma A, Early BAFF receptor blockade mitigates murine Sjögren's syndrome: Concomitant targeting of CXCL13 and the BAFF receptor prevents salivary hypofunction, Clin Immunol, 2016.

Moser B, CXCR5, the defining marker for follicular B helper T (TFH) cells, Front. Immunol, 2015.

【序列表】

<110> 香港商高誠生物醫藥（香港）有限公司(HIFIBIO (HK) LIMITED)

<120> 抗人類CXCR5抗體及其用途

<130> 131206-00620

<140> TW 111108626
<141> 2022-03-09

<150> PCT/CN2021/111049
<151> 2021-08-05

<150> US 63/158,462
<151> 2021-03-09

<160> 187

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 2
Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 3
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 3
Thr Pro Pro Asn Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 4
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser
20 25

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 5
Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10 15

Gln

<210> 6
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 6
His Tyr Thr Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
1 5 10 15

Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
35

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 7
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 8
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Thr Glu
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Pro Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 9
Thr Ser Leu Leu His Arg Ser Gly Lys His Lys
1 5 10

<210> 10
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 10
Tyr Val Ser
1

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 11
Met Gln Ser Leu Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 12
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Thr Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ser Thr
20 25

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 13
Phe Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 14
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 14
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Phe Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 15
Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Thr Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ser Thr Thr Ser Leu Leu His Arg
20 25 30

Ser Gly Lys His Lys Phe Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Tyr Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Leu Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 17
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn Ala
1 5

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

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 18
Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 19
Val Ser Trp Asp Pro Phe Ala Tyr

1 5

<210> 20
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 21
Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10 15

Arg

<210> 22
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 22
His Tyr Val Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
1 5 10 15

Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
35

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 23
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
20 25 30

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Val Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Ser Trp Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 25
Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 26
Trp Ala Ser
1

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 27
His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr
1 5

<210> 28
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 28
Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser
20 25

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 29
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 30
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 30
Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Thr Glu Asp Leu Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 31
Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 32
Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 33
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 34
Thr Trp Ser Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 35
Ala Arg Gly Gly Asn Tyr
1 5

<210> 36
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 36
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 37
Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10 15

Val

<210> 38
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 38
Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
35

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 39
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 40
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Thr Trp Ser Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 41
Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe
1 5 10

<210> 42
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 42
Ala Ala Ser
1

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 43
Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 44
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 44
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 45
Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 46
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 46
Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala
20 25 30

Met Tyr Phe Cys
35

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 47
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 48
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Gln Val Gln Leu Lys Glu
65 70 75 80

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys
85 90 95

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg
100 105 110

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp
115 120 125

Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln
145 150 155 160

Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Tyr Trp Gly
165 170 175

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
180 185 190

Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu
195 200 205

Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
210 215 220

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 49
Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 50
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 50
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 51
Ala Arg Val Val Tyr
1 5

<210> 52
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 52
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 53
Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10 15

Val

<210> 54

<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 54
Asn Tyr His Ser Gly Leu Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 55
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 56
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Gly Leu Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 57
Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 58
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 58
Arg Met Ser
1

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 59
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 60
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 60
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 61
Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr

<210> 62
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 62
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 63
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn 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

<210> 64
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 64
Asn Tyr His Ser Thr Leu Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 65
Ala Arg Val Ala Tyr
1 5

<210> 66
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 66
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 67
Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 68
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 68
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn 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 Met Ser Asn 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

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 69
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 70
Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Ile
1 5

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 71
Ala Arg Gly Leu Arg Arg Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 72
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 72
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 73
Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Trp

<210> 74
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 74
Lys Tyr Asn Asp Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Lys
1 5 10 15

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
20 25 30

Ser Ala Val Tyr Phe Cys
35

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 75
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Ile Lys Tyr Asn Asp Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Arg Arg Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 76

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr
1 5 10

<210> 77
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 77
Gln Met Ser
1

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 78
Ala Gln Ser Leu Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 79
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 79
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 80
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 80
Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 81
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 81
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 82
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 83
<211> 112

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 83
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ser
85 90 95

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

<210> 84
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 84
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 85
Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10 15

Val

<210> 86
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 86
Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu
1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 87
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 88
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 88
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 89
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 89
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
20 25

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 90
Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10 15

Val

<210> 91
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 91
Asn Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
1 5 10 15

Ser Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 92
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 92
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 Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Ala Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 93
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 93
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
20 25

<210> 94

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 94
Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Val

<210> 95
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 95
Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 96
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 96
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 Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 97
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 97
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 98

Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 99
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 99
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 100
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 101
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 101
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys 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 Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 102
Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr

<210> 103
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 103
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 Ser Ser
20 25

<210> 104
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 104
Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr

<210> 105
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 105
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 106
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 106
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 Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 107
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 107
Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 108
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 108
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 109
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 109
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 Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 110
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 110
Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Lys Asp Thr
1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 111

<400> 111
000

<210> 112
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 112
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

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

<210> 113
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 113
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
50 55 60

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

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

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 114
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val Ser
1 5 10

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 115
Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn
1 5

<210> 116
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 116
Val Val Tyr

1

<210> 117
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 117
Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 118
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 118
Tyr His Ser Gly Leu Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser
1 5 10 15

Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr
20 25 30

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
35

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 119
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 120
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 121
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 121
Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 122
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 123
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 123
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Ile Ser Cys
20

<210> 124
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 124
Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 125
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 125
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
1 5 10 15

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 126
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 126
Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 127

<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 127
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
1 5 10 15

Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35

<210> 128
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 128
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 129
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 129
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 130
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 130
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 131
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 132
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 132
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 133
<211> 14
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 133
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 134
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 134
Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Lys Asp Thr Ser
1 5 10 15

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35

<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 135
Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 136
<211> 36

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 136
Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Val Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 137
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 137
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys 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 Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 138
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 138
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 139
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 139
Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Lys
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 140
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 140
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Lys Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 141
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 141
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 142
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 142
Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10 15

Val

<210> 143
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 143
Asn Tyr His Ser Gly Leu Ile Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 144
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 144
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Gly Leu Ile
50 55 60

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

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

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 145
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 145
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 Arg Ser Ser
20 25

<210> 146
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 146
Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu

1 5 10 15

Tyr

<210> 147
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 147
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 148
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 148
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 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

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

<210> 149
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 149
Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10

<210> 150
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 150
Arg Gly Ser
1

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 151

Met Gln His Leu Gln Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 152
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 152
Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 153
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 153
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys 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 Gln Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 154
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 154
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 155
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 155
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys 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

<210> 156

<400> 156
000

<210> 157

<400> 157
000

<210> 158

<400> 158
000

<210> 159

<400> 159
000

<210> 160

<400> 160
000

<210> 161

<400> 161
000

<210> 162

<400> 162
000

<210> 163

<400> 163
000

<210> 164

<400> 164
000

<210> 165
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 165
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

<210> 166
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 166
Gln Tyr Asn Ser Thr
1 5

<210> 167
<211> 372
<212> PRT
<213> 智人

<400> 167
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> 168
<211> 368
<212> PRT
<213> 智人

<400> 168
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> 169
<211> 116
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 169
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Thr Glu
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Pro Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 170
<211> 117
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 170
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
20 25 30

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Val Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Ser Trp Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 171
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 171
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Thr Trp Ser Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 172
<211> 111
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 172
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Gly Leu Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

<210> 173
<211> 111
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 173
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

<210> 174
<211> 117

<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 174

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

<210> 175
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 175

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

Ser Gly Lys His Lys Phe Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Tyr Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Leu Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 176
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 176
Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 177
<211> 111
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 177
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly 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 Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

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

<210> 178
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 178
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn 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

<210> 179
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 179
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn 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 Met Ser Asn 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

<210> 180
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 180
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ser
85 90 95

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

<210> 181
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 181
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

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

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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 182
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 182
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 Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Ala Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 183
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 183
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 Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 184
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 184
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys 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 Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 185
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 185
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys 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 Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 186
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 186
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 Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 187
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明：合成多肽

<400> 187
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 Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

【發明申請專利範圍】

【請求項1】　一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5具特異性，且其中該單株抗體包含：

(1)　重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列；其中該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；視情況，該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一單株抗體之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；及/或

(2)　輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列；其中該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VLCDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列；視情況，該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一單株抗體之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【請求項2】　如請求項1之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中：

(1)　該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 1、2及3之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 9、10及11之胺基酸序列；

(2)　該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 17、18及19之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 25、26及27之胺基酸序列；

(3)　該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、34及35之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序

列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 41、42及43之胺基酸序列；

(4) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列；

(5) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及65之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列；

(6) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 69、70及71之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 76、77及78之胺基酸序列；

(7) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 149、150及151之胺基酸序列；或

(8) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 114、115及116之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 120、121及122之胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體為小鼠-人類嵌合抗體，該小鼠-人類嵌合抗體包含人類抗體(諸如hIgG1、hIgG2、hIgG3或hIgG4)之恆定區序列，其中該VH序列為SEQ ID NO: 8、24、40、56、65或75中之任一者或與SEQ ID NO: 8、24、40、56、65或75之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，及/或其中該VL序列為SEQ ID

NO: 16、32、48、63、68或83中之任一者或與SEQ ID NO: 16、32、48、63、68或83之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【請求項4】　如請求項3之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中：

(1)　該VH序列為SEQ ID NO: 8或與SEQ ID NO: 8具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 16或與SEQ ID NO: 16具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(2)　該VH序列為SEQ ID NO: 24或與SEQ ID NO: 24具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 32或與SEQ ID NO: 32具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(3)　該VH序列為SEQ ID NO: 40或與SEQ ID NO: 40具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 48或與SEQ ID NO: 48具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(4)　該VH序列為SEQ ID NO: 56或與SEQ ID NO: 56具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 63或與SEQ ID NO: 63具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(5)　該VH序列為SEQ ID NO: 65或與SEQ ID NO: 65具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 68或與SEQ ID NO: 68具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；或

(6) 該VH序列為SEQ ID NO: 75或與SEQ ID NO: 75具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 83或與SEQ ID NO: 83具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【請求項5】 如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體為人類化抗體，視情況，該人類化抗體包含：

(1) 表B、表D及表E中之任一單株抗體之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列；及/或表C、表D及表E中之任一單株抗體之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(2) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(3) SEQ ID NO: 113之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(4) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 101之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(5) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 109之

VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列。

【請求項6】　如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該人類化抗體包含：

(1)　VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4，該VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4：

(i)　屬於表B及表D中之任一抗體，

(ii)　分別包含與SEQ ID NO: 84、85、86及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(iii)　分別包含與SEQ ID NO: 89、90、91及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或

(iv)　分別包含與SEQ ID NO: 93、94、95及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(v)　分別包含與SEQ ID NO: 132、85、133及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(vi)　分別包含與SEQ ID NO: 93、126、127及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(vii)　分別包含與SEQ ID NO: 132、133、134及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列

一致性)或一致之胺基酸序列；

(viii) 分別包含與SEQ ID NO: 138、94、139及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或

(ix) 分別包含與SEQ ID NO: 141、142、143及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；及/或

(2) VL構架區序列VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4，該VL構架區序列VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4：

(i) 屬於表C及表D中之任一抗體，

(ii) 分別包含與SEQ ID NO: 97、98、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(iii) 分別包含與SEQ ID NO: 97、102、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(iv) 分別包含與SEQ ID NO: 103、104、105及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(v) 分別包含與SEQ ID NO: 103、107、108及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(vi) 分別包含與SEQ ID NO: 134、135、136及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列

一致性)或一致之胺基酸序列；

(vii) 分別包含與SEQ ID NO: 128、129、130及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(viii) 分別包含與SEQ ID NO: 145、146、147及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(ix) 分別包含與SEQ ID NO: 97、98、152及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或

(x) 分別包含與SEQ ID NO: 154、102、99及47之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【請求項7】 如請求項6之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中：

(1) 該VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4序列分別包含

(i) SEQ ID NO: 93、94、95及87；

(ii) SEQ ID NO: 132、85、133及87；

(iii) SEQ ID NO: 93、126、127及87；或

(iv) SEQ ID NO: 132、133、134及87；及/或

(2) 該VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4序列分別包含

(i) SEQ ID NO: 134、135、136及131；或

(ii) SEQ ID NO: 128、129、130及131。

【請求項8】 如請求項7之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中

(1) 該VH序列包含SEQ ID NO: 96之胺基酸序列且該VL序列包含SEQ ID

NO: 112之胺基酸序列；或

(2) 該VH序列包含SEQ ID NO: 113之胺基酸序列且該VL序列包含SEQ ID NO: 112之胺基酸序列。

【請求項9】 如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該VH序列包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列且VL序列包含SEQ ID NO: 111之胺基酸序列。

【請求項10】 如請求項1-9中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其包含經修飾之Fc區以增強ADCC。

【請求項11】 如請求項10之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該經修飾之Fc區包含：

(1) F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L突變以增強FcγRIIIa結合；

(2) S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合；

(3) S239D/I332E/A330L突變以同時增強FcγRIIIa結合且降低FcγRIIIb結合；

(4) S298A/E333A/K334A突變以增強FcγRIIIa結合；及/或

(5) Fc區之非海藻糖基化N297以增強FcγRIIIa結合。

【請求項12】 如請求項1-9中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該其抗原結合片段為Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【請求項13】 如請求項1-12中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其ADCC活性具有低(例如1-5或1-2) pM範圍EC50值。

【請求項14】 如請求項1-13中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，

其針對表現表面hCXCR5之原代B細胞及/或表現表面hCXCR5之原代T細胞具有ADCC活性。

【請求項15】 如請求項1-14中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【請求項16】 如請求項1-15中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其抑制cAMP信號傳導(例如EC50小於1 nM)。

【請求項17】 如請求項1-16中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其抑制趨化性(例如在約0.1-0.5 nM或約0.1 nM下具有約100%抑制)。

【請求項18】 如請求項1-17中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其抑制hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【請求項19】 如請求項1-18中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其實質上不與hCXCR3交叉反應。

【請求項20】 如請求項1-19中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其結合至黏附細胞株(諸如DX002)及/或懸浮細胞株(諸如M300-19)上所表現之hCXCR5。

【請求項21】 如請求項1-20中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其不與或最低限度地與hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物交叉反應。

【請求項22】 如請求項1-21中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其降低個體中記憶B細胞群體之百分比。

【請求項23】 如請求項1-22中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其以小於約25 nM、20 nM、15 nM、10 nM、5 nM、2 nM或1 nM或更小之K_d結合hCXCR5。

【請求項24】 一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其與如請求項1-23中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段競爭結合至相同抗原決定基。

【請求項25】 一種治療有需要之個體之休格蘭症候群(Sjögren syndrome，SS)的方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體。

【請求項26】 如請求項25之方法，其緩解SS之至少一種症狀。

【請求項27】 一種治療有需要之個體之具有異位生髮中心(GC)之疾病或適應症之方法，該疾病或適應症包括自體免疫疾病或病症，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體。

【請求項28】 如請求項27之方法，其中該疾病或適應症為類風濕性關節炎(RA)、系統性紅斑狼瘡(SLE)、乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn’s disease)、潰瘍性結腸炎、I型糖尿病、多發性硬化(MS)、類肉瘤病、銀屑病、重症肌無力、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto’s thyrioiditis)、格雷夫斯氏病(Grave’s disease)、動脈硬化、結膜炎、胃炎、肝炎或皮炎。

【請求項29】 一種治療有需要之個體之淋巴瘤或白血病的方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體。

【請求項30】 如請求項29之方法，其中該淋巴瘤或白血病為B細胞淋巴瘤。

【請求項31】 如請求項30之方法，其中該B細胞淋巴瘤為CLL (B細胞慢性淋巴細胞性白血病)。

【請求項32】 如請求項30之方法，其中該淋巴瘤或白血病為非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin’s lymphoma)，諸如伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)。

【請求項33】 一種治療有需要之個體之實體癌症的方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體，其中該實體癌症為胃癌、乳癌、腸癌、肺癌或前列腺癌。

【請求項34】 如請求項29-33中任一項之方法，其進一步包括向患者投與化學治療劑、抗血管生成劑、生長抑制劑、免疫腫瘤劑及/或抗贅生組合物。

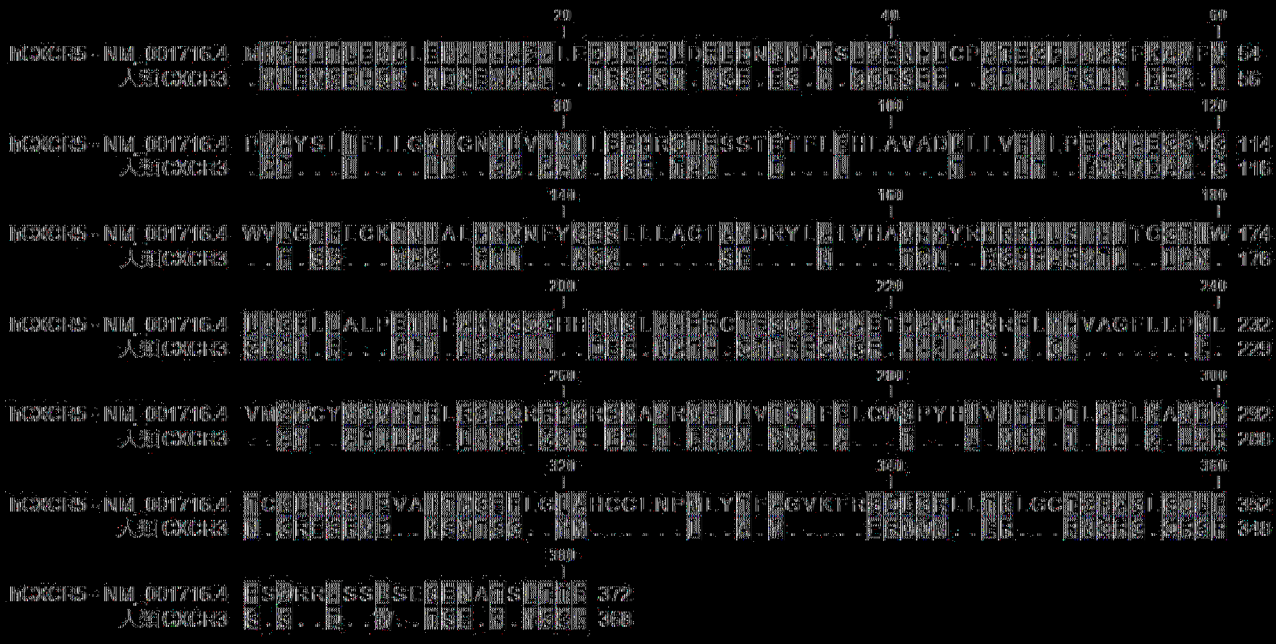
【請求項35】　一種聚核苷酸，其編碼如請求項1-24中任一項之重鏈或輕鏈或其抗原結合部分。

【請求項36】　如請求項35之聚核苷酸，其經密碼子優化以便在人類細胞中表現。

【請求項37】　一種載體，其包含如請求項35或36之聚核苷酸。

【請求項38】　如請求項37之載體，其為表現載體(例如哺乳動物表現載體、酵母表現載體、昆蟲表現載體或細菌表現載體)。

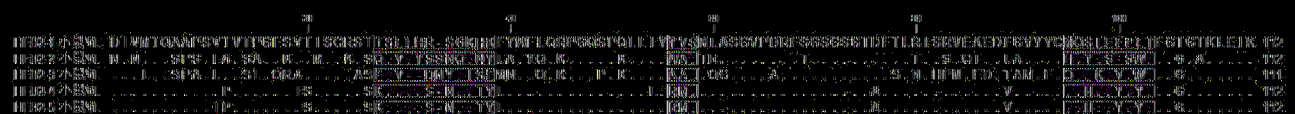
(發明圖式)


20
40
60
MOXCR5 - NM_001716.4
人類CXCR3
80
100
120
MOXCR5 - NM_001716.4
人類CXCR3
140
160
180
MOXCR5 - NM_001716.4
人類CXCR3
200
220
240
MOXCR5 - NM_001716.4
人類CXCR3
260
280
300
MOXCR5 - NM_001716.4
人類CXCR3
320
340
360
MOXCR5 - NM_001716.4
人類CXCR3
380
MOXCR5 - NM_001716.4
人類CXCR3

(圖 1)

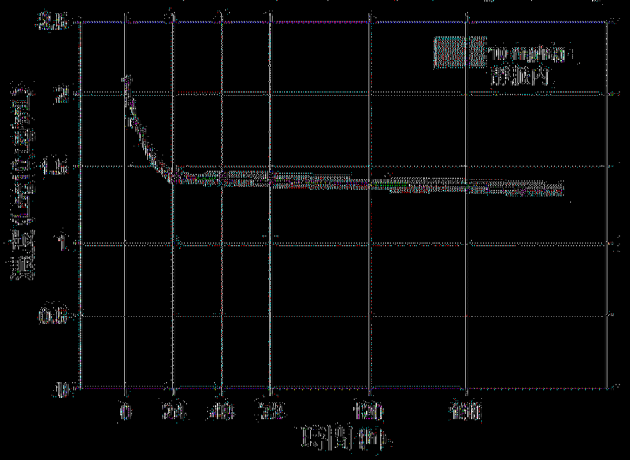


|(圖 2A)|

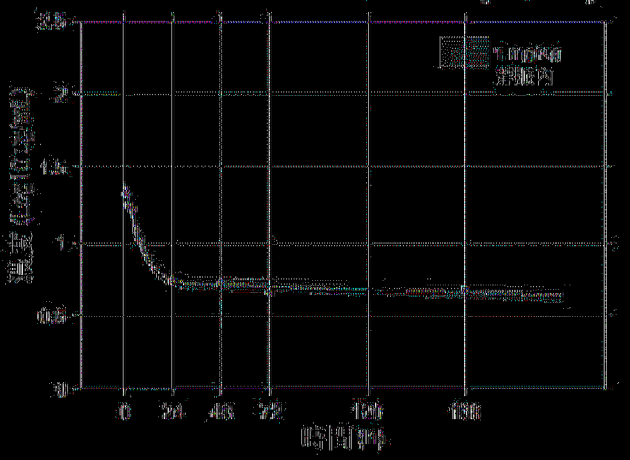


|(圖 2B)|

HBP-4h61在小鼠中之PK(實驗1)



HBP-4h61在小鼠中之PK(實驗2)

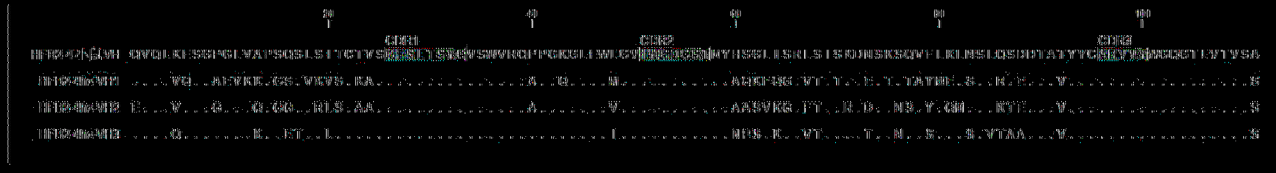


PK參數(實驗1)	單位	數值
C_0	123	μg/ml
$t_{1/2}$	158	h
$AUC_{(0-inf)}$	5970	h*μg/ml

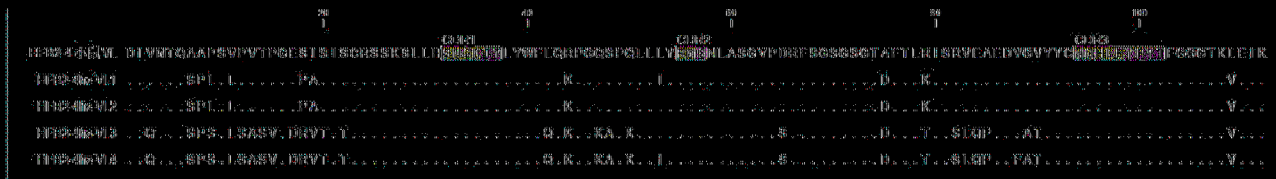
- 動性清除率
- 注兩種試驗中驗證了>6天之半衰期
- 與小鼠中性抗原結合之抗體的預期的預期一致

未於二次給藥之組合，使用內部PK分析數據

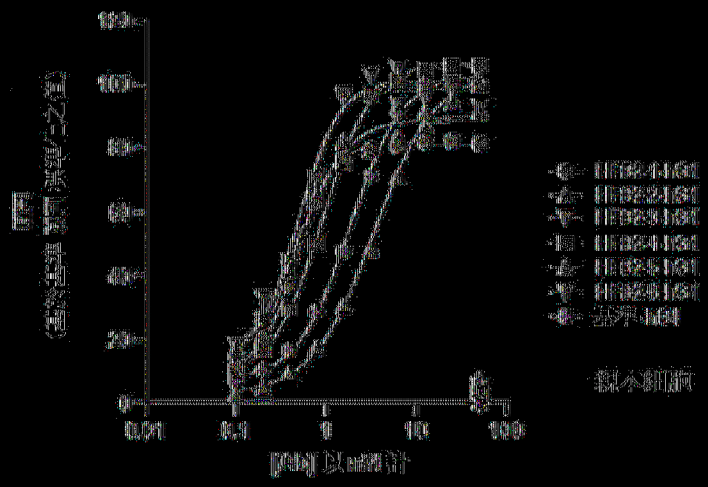
[圖 3]



|(圖 4A)|

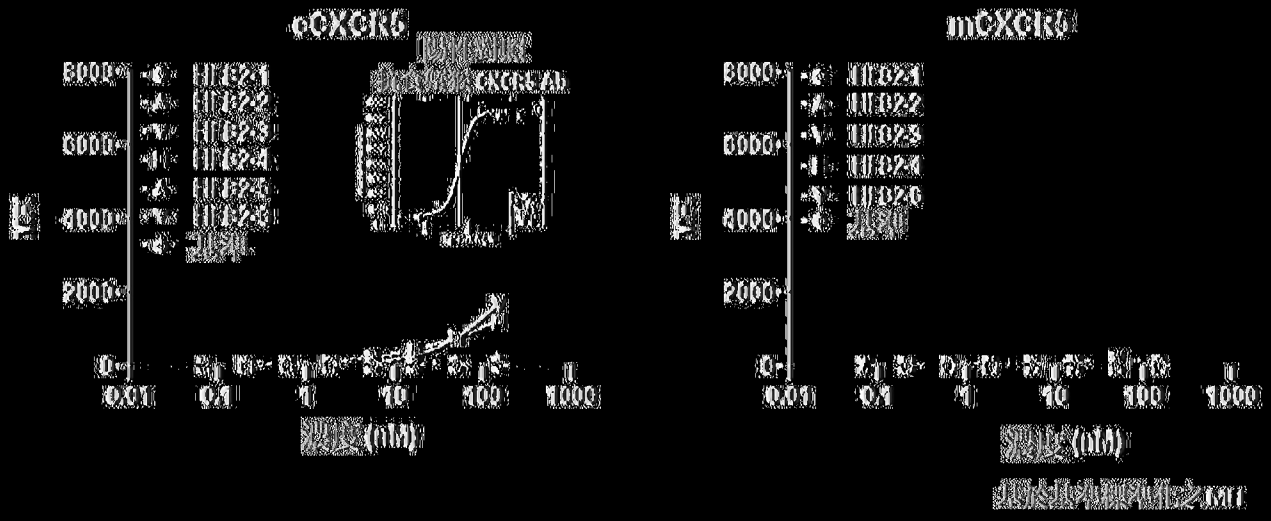


|(圖 4B)|

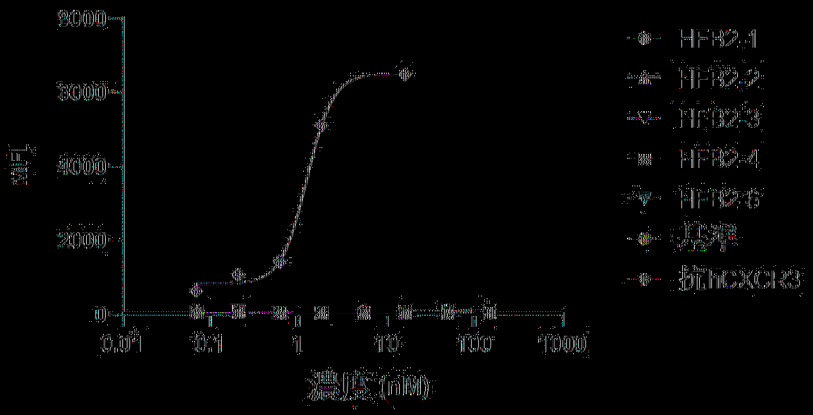


	HER2-1-hG1	HER2-2-hG1	HER2-3-hG1	HER2-4-hG1	HER2-5-hG1	HER2-6-hG1	比較-hG1
IC50 [nM]	0.4810	0.4821	0.5004	0.8215	0.950	0.9805	1.052

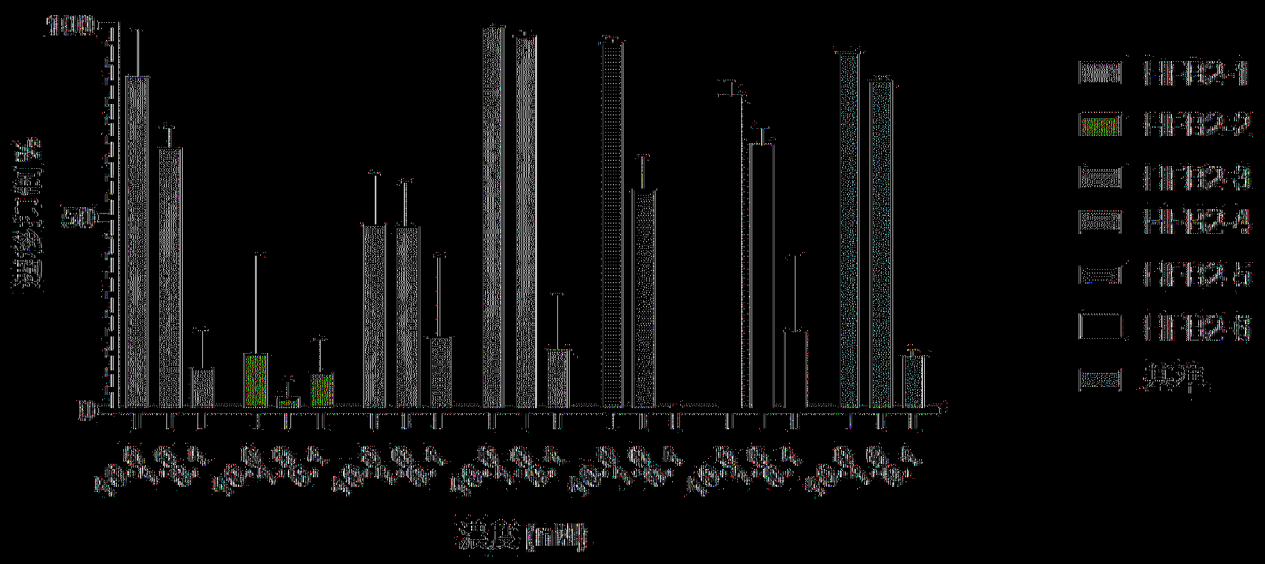
(圖 5)


mCXCR5
HFB2-1
HFB2-2
HFB2-3
HFB2-4
HFB2-5
HFB2-6
對照組
3000
2000
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
mCXCR6
HFB2-1
HFB2-2
HFB2-3
HFB2-4
HFB2-6
對照組
3000
2000
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)

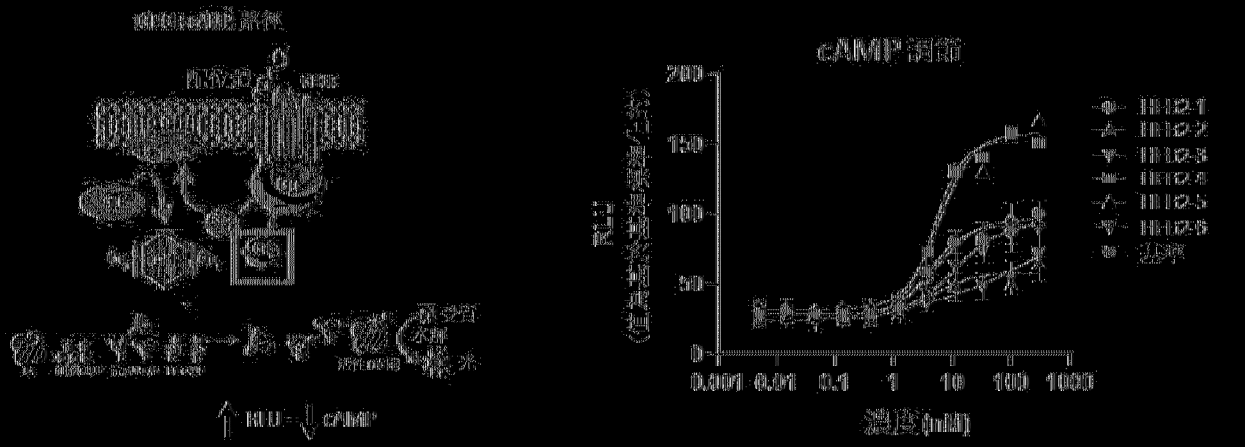
[圖 6A]


3000
2000
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HFB2-1
HFB2-2
HFB2-3
HFB2-4
HFB2-5
對照組
抗hCXCR3

[圖 6B]



[圖7]



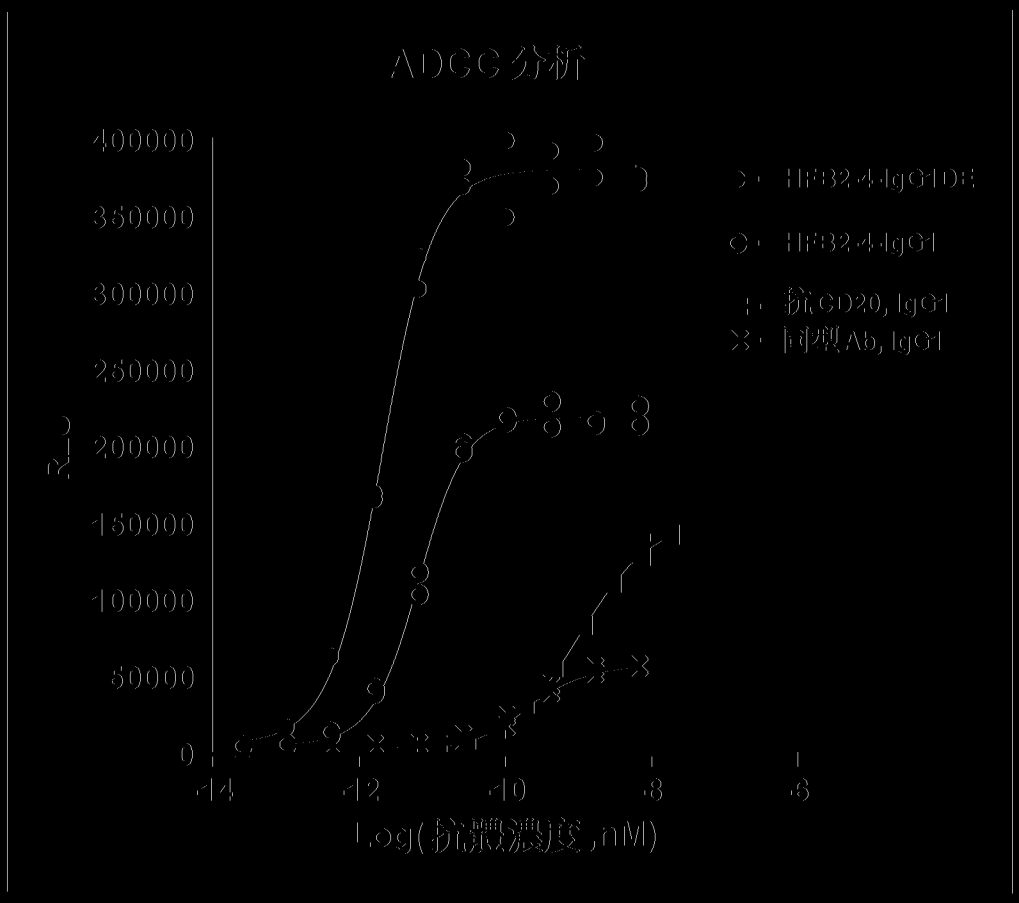
	IIH2-1-h61	IIH2-2-h61	IIH2-3-h61	IIH2-4-h61	IIH2-5-h61	IIH2-6-h61	比較-h61
EC50 (nM)	0.57	0.92	0.45	0.49	1.66	0.57	0.92
已投入研發第2年之時間	94	62	68	102-108	153	90	100

圖 8



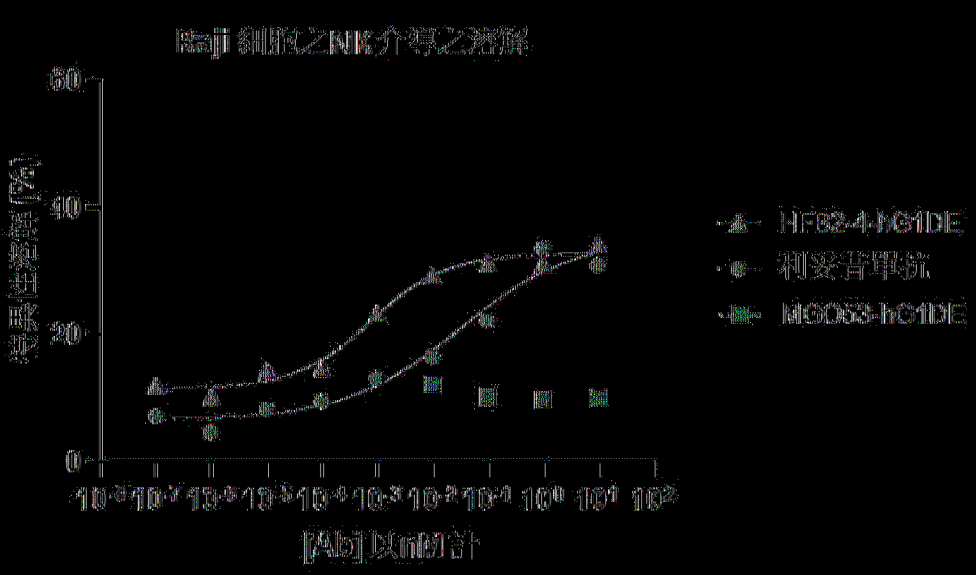
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	0.007	0.3	0.08	0.01	0.01	0.5
[illegible]	38	20	62	106	66	84

[圖 9A]



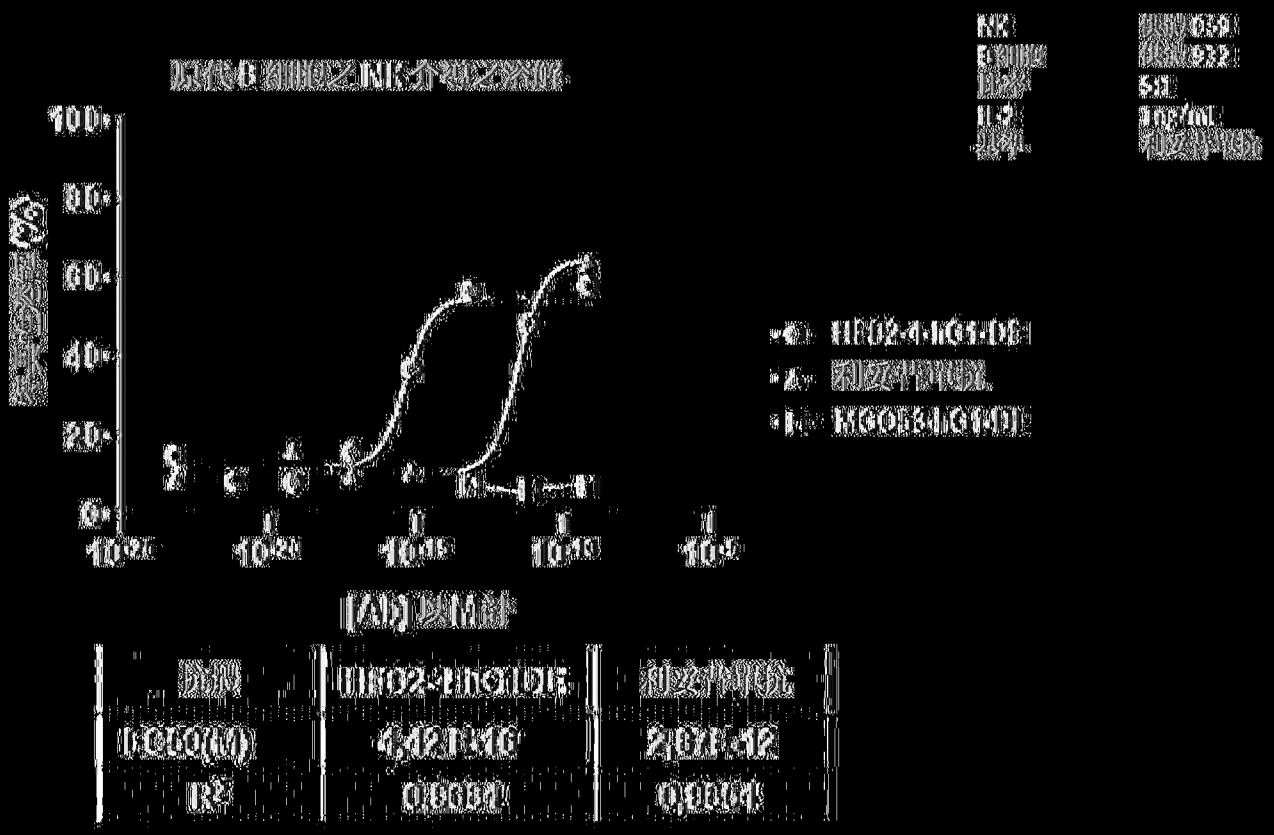
	HFB24-IgG1DE	HFB24-IgG1	抗CD20
EC50 (nM)	0.002	0.006	2.6

[圖 9B]



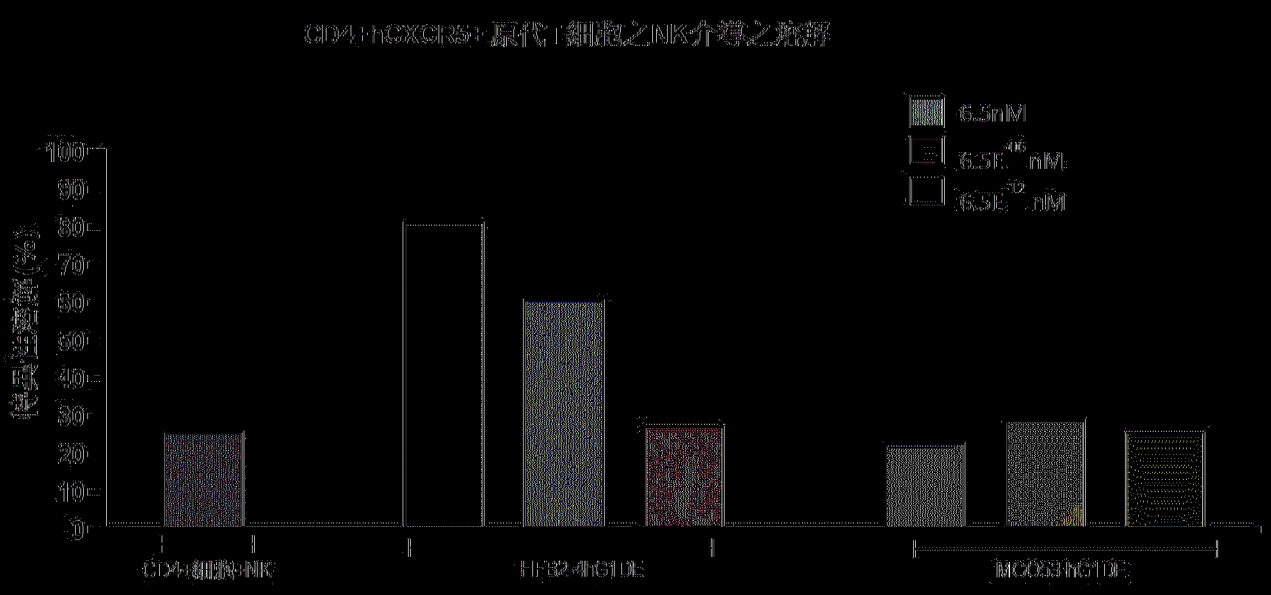
	HFB2-4-hG1DE	利妥昔單抗
EC50 (M)	7,68E-10	3,33E-09
R2	0,985	0,965

[圖 9C]

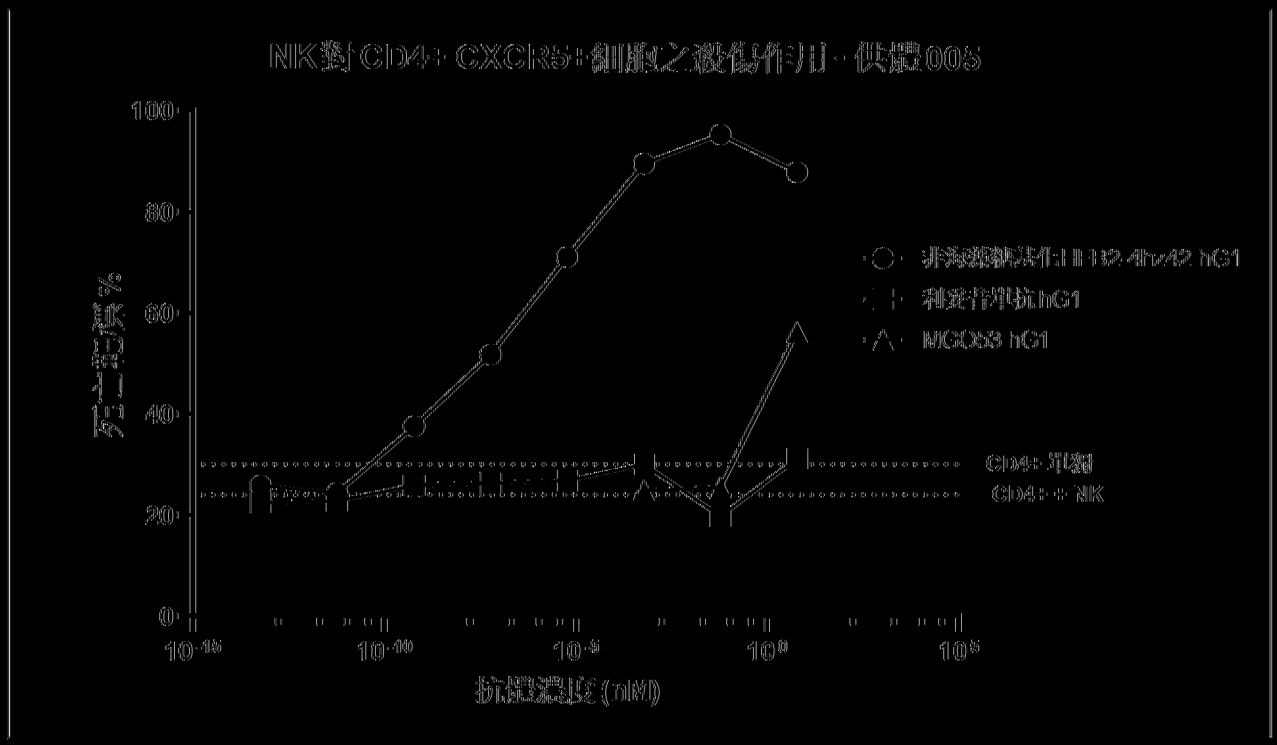


[AB]型抗體		
抗體	HR02-4-HG51-DE	對照抗體
EC50(M)	4.42E-10	2.03E-12
R^2	0.9681	0.9804

[圖 9D]

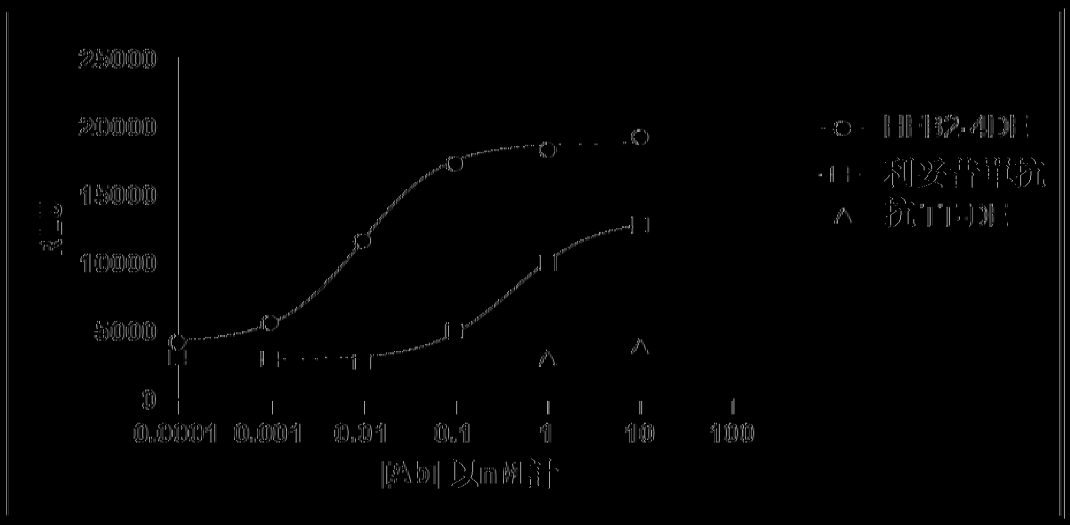

CD4+hCXCR5+原代T細胞之NK介導之殺傷
6.5nM
6.5E-06 nM
6.5E-12 nM
殺傷百分比(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CD4+細胞+NK
HER2-NS1DE
MOCHG1DE

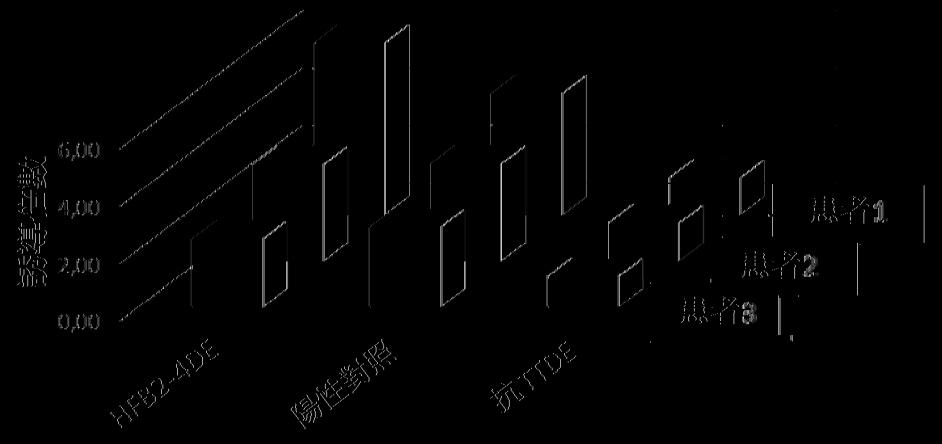
[圖 9E]


NK對CD4+ CXCR5+細胞之殺傷作用 - 供體005
100
80
60
40
20
0
% 最大值
非糖基化作用 H1 B2.4v42.hG1
利妥昔單抗.hG1
WG353.hG1
CD4+ 淨額
CD4+ NK
10-15
10-10
10-5
100
105
抗體濃度 (nM)

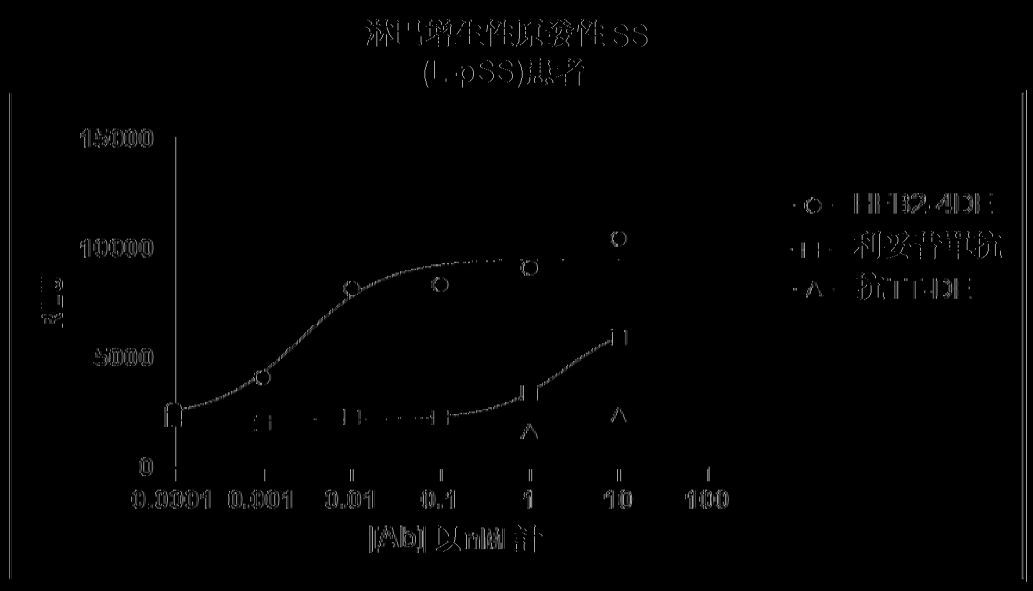
[圖 9F]

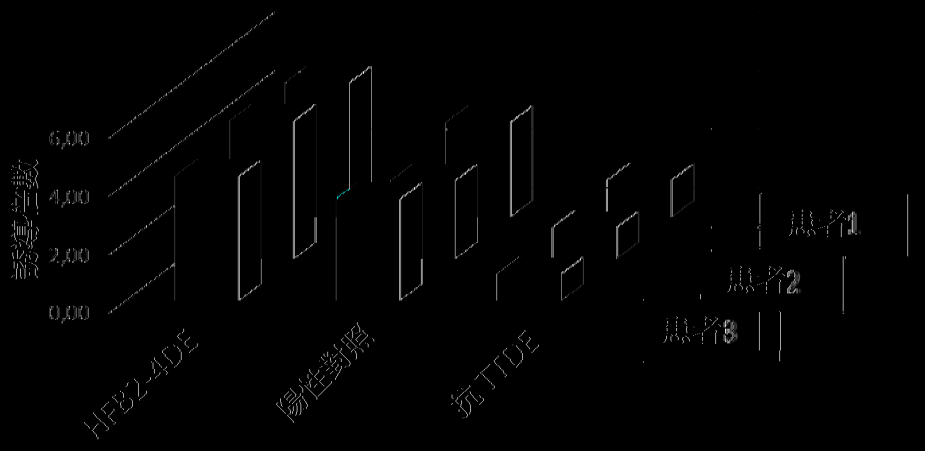
原發性SS (pSS)患者



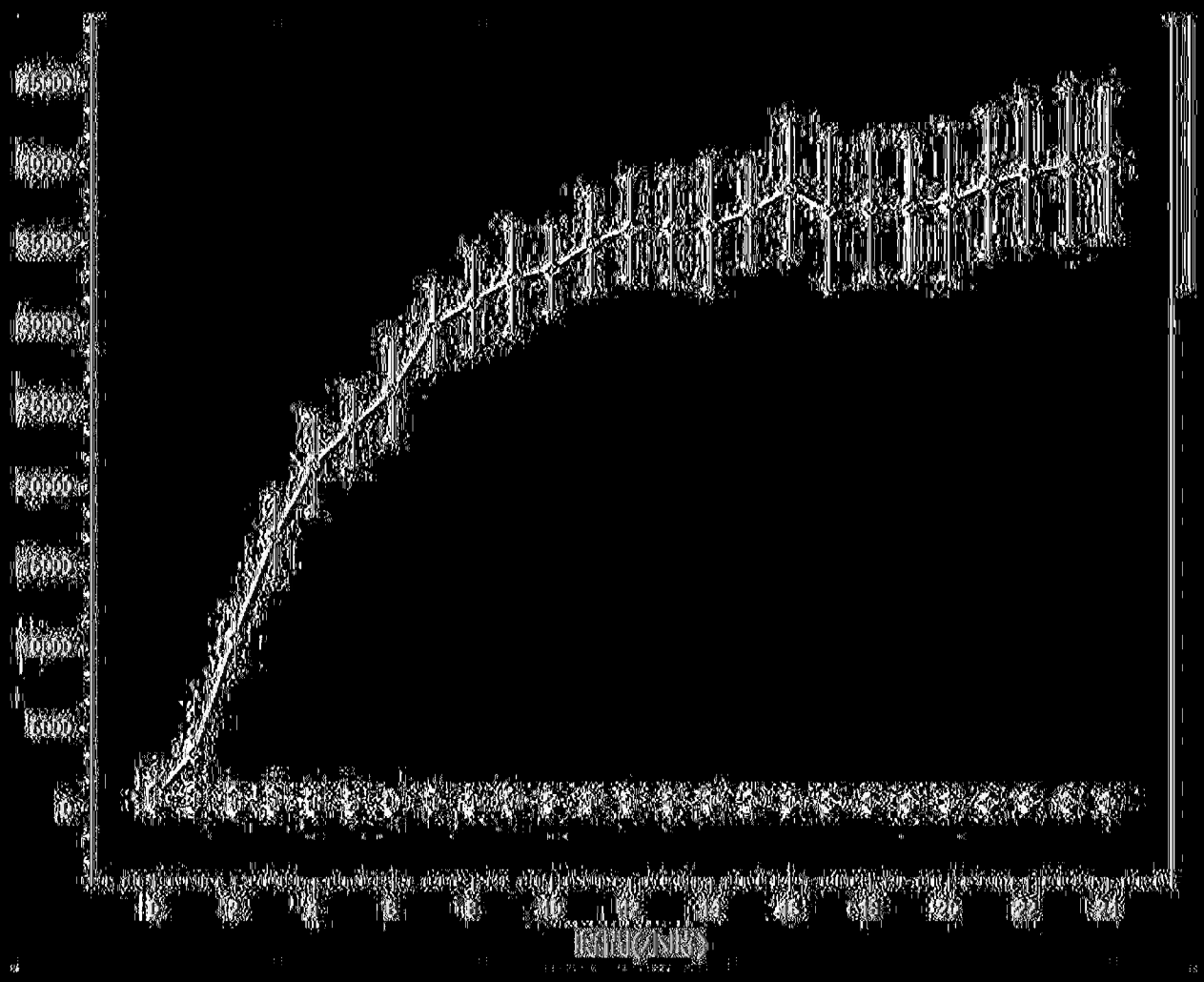


[(圖 9G)]

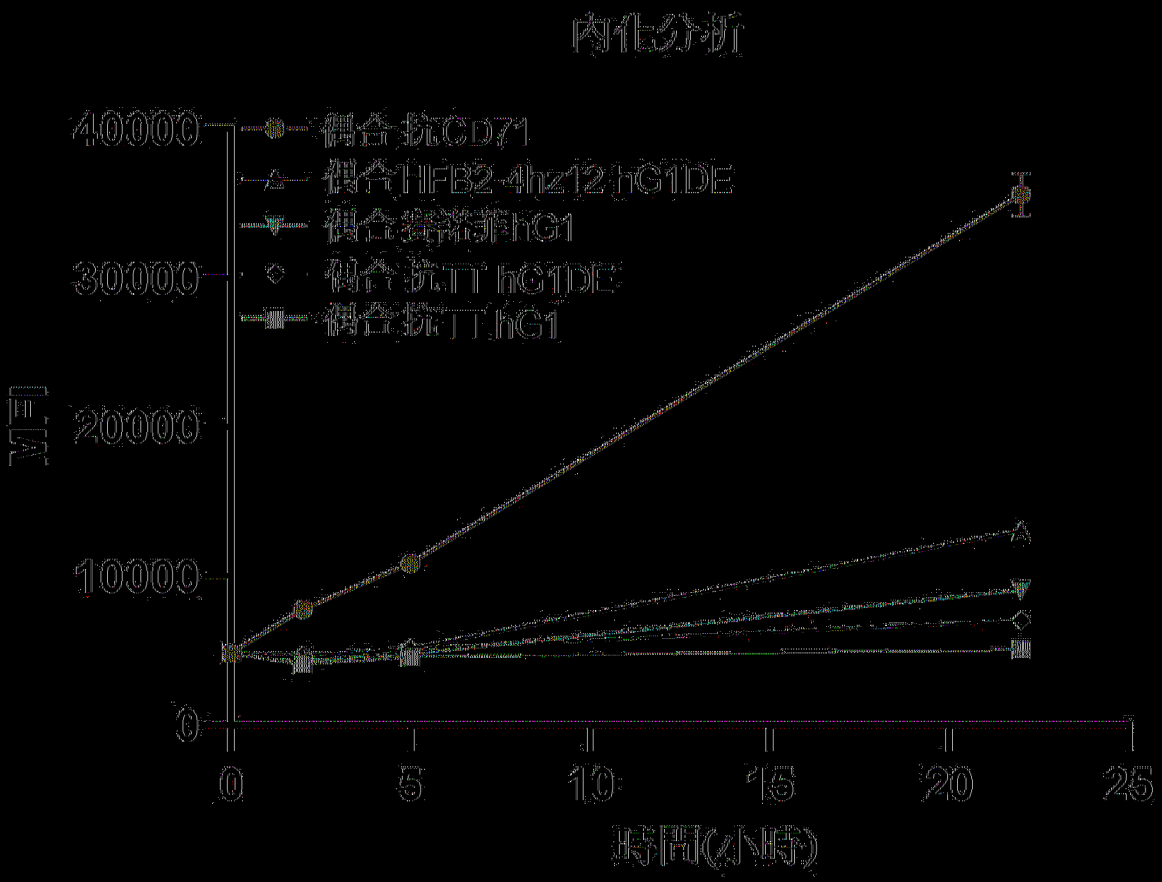

淋巴增生性抗發性SS
(L-pSS)患者
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[Ab] 以mM計
HEK-4DE
利妥昔單抗
抗TDE


6,00
4,00
2,00
0,00
HEK-4DE
陽性對照
抗TDE
患者1
患者2
患者3

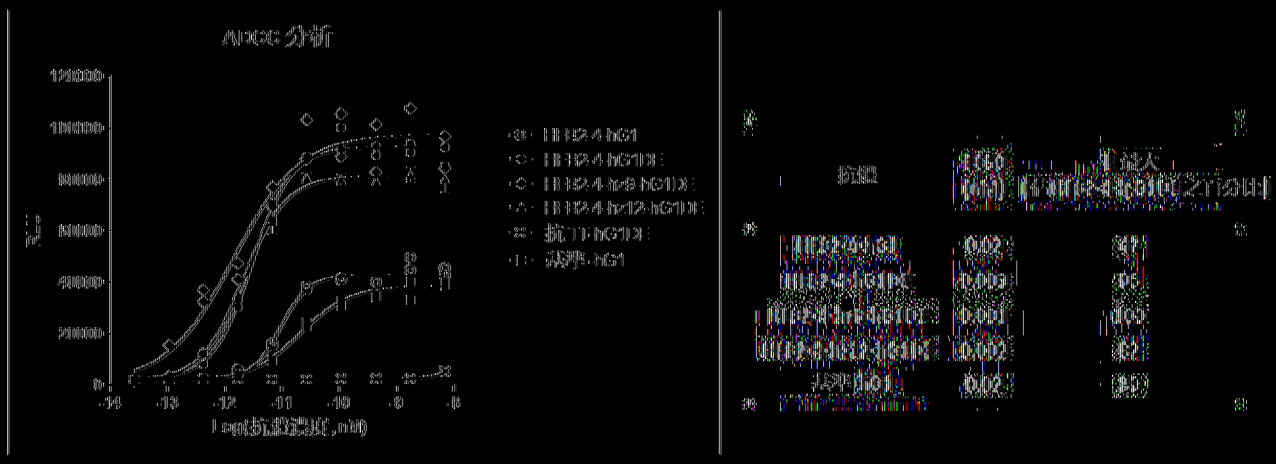
[(圖 9D)]


45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
時間(小時)

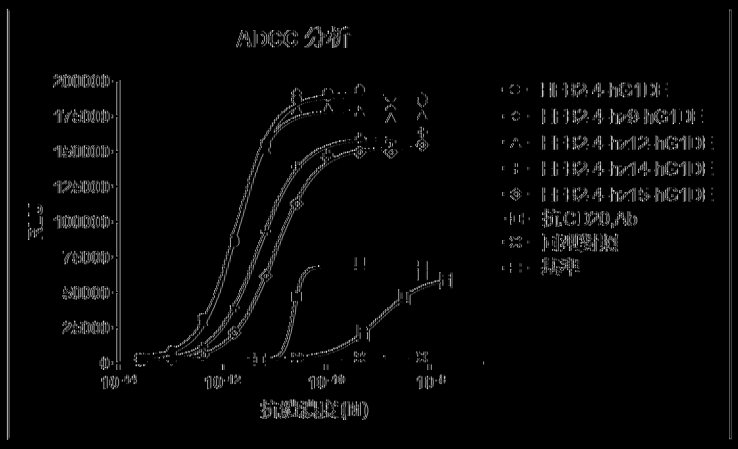
[圖 10A]


內化分析
40000
30000
20000
10000
0
RFU
0
5
10
15
20
25
時間(小時)
偶合抗CD71
偶合HFB2-4hz12.hG1DE
偶合對照hG1
偶合抗TF hG1DE
偶合抗TF hG1
Mab偶合至pHAb試劑染料
所用之濃度為8nM

[圖 10B]

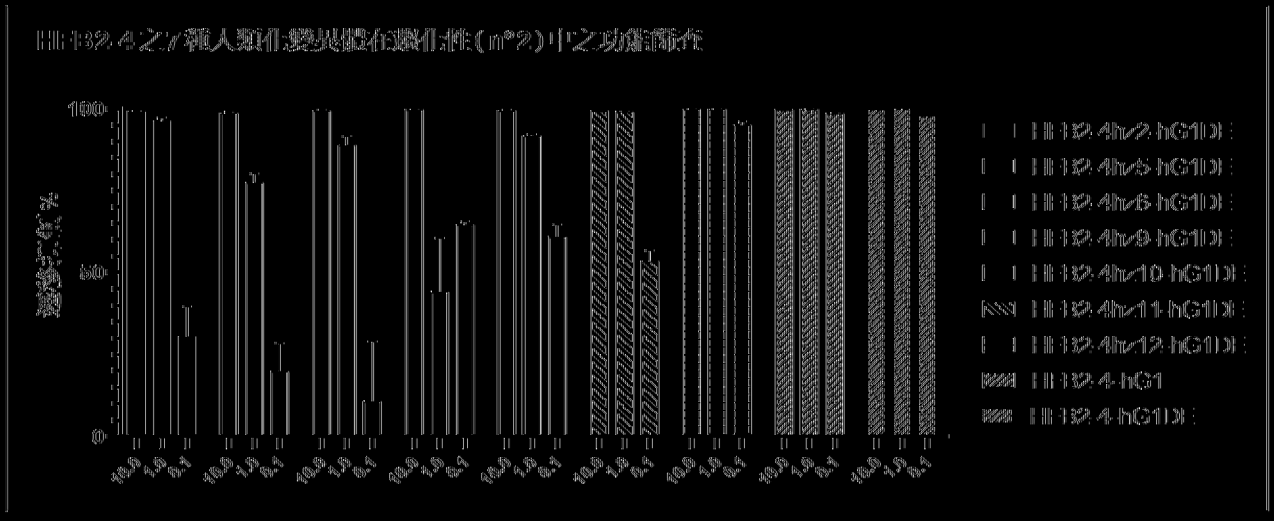

ADCC分析
螢光強度
抗體濃度(log M)
hB1B24-hG1
hB1B24-hG1D
hB1B24-hv3-hG1D
hB1B24-hv13-hG1D
抗TF-hG1D
對照-hG1
抗體
EC50 (nM)
最大螢光強度(%)
hB1B24-hG1
hB1B24-hG1D
hB1B24-hv3-hG1D
hB1B24-hv13-hG1D
對照-hG1

|(圖 11A)|

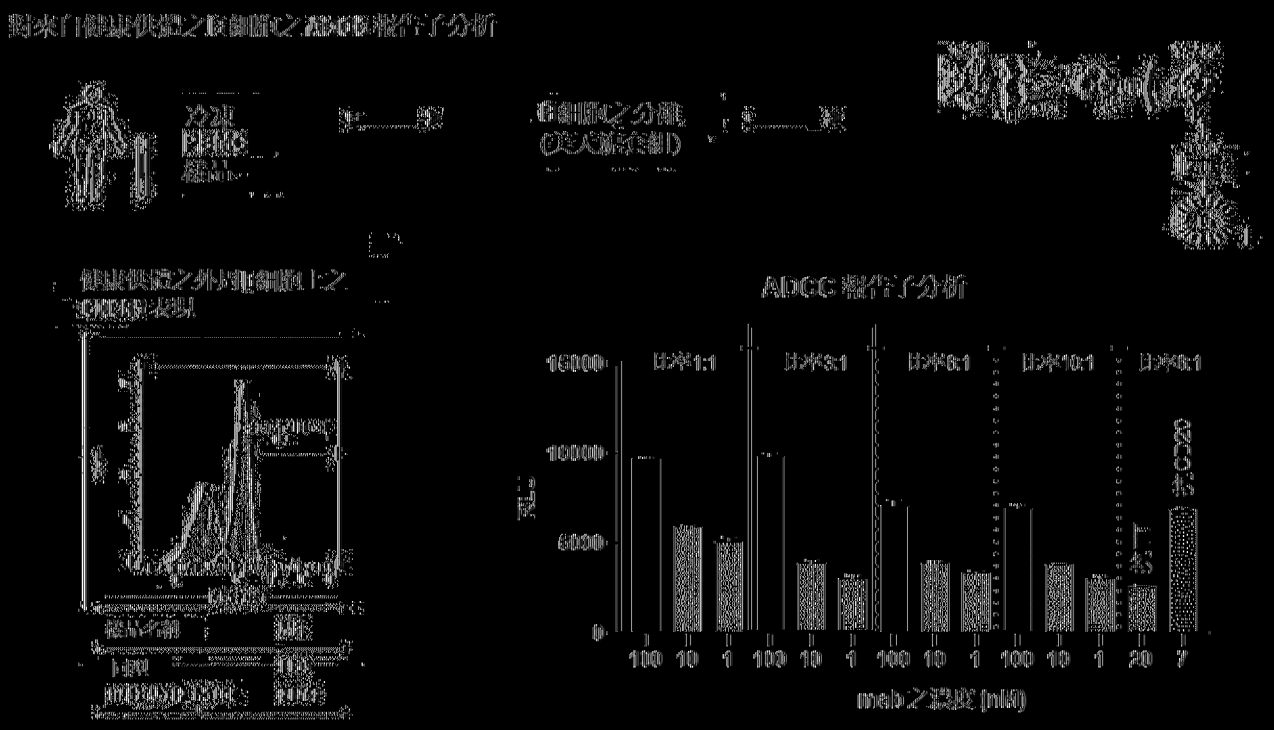


抗體 (hG1D)	EC50 (nM)	最大 (相對於hIL2Rα-hG1D之百分比)
hIL2Rα-h	0.007	0.007
hIL2Rα-hn9	0.007	0.007
hIL2Rα-hn12	0.007	0.007
hIL2Rα-hn14	0.005	0.005
hIL2Rα-hn15	0.01	0.01

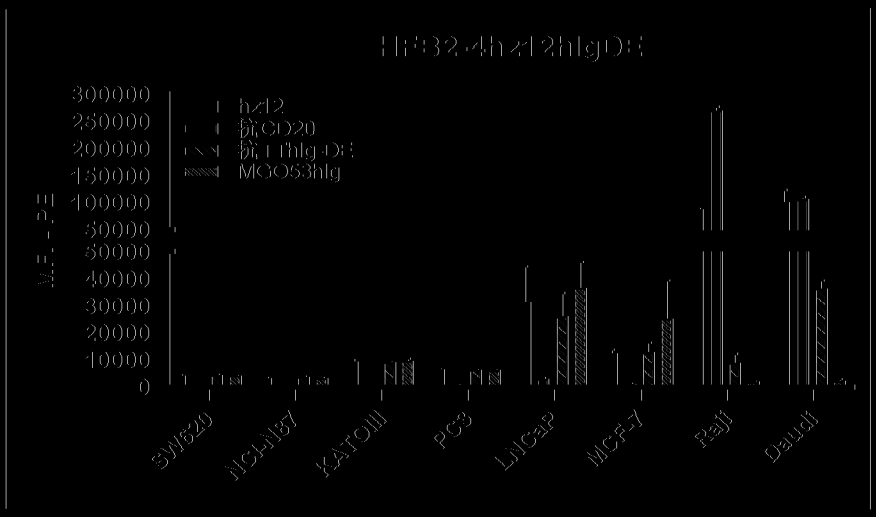
[(圖 11B)]


HER2 4 2 hG1D
100
50
0
HER2 hG1D
HER2 4hv2 hG1D
HER2 4hv5 hG1D
HER2 4hv6 hG1D
HER2 4hv9 hG1D
HER2 4hv10 hG1D
HER2 4hv11 hG1D
HER2 4hv12 hG1D
HER2 4 hG1
HER2 4 hG1D

|(圖 12)|


對來自健康供體之原代細胞之ADCC報告子分析
分離
單核
細胞
自個別之分離
(5次獨立實驗)
健康供體之外周血細胞上之
CD16a表現
ADCC報告子分析
16000
10000
6000
0
日米1:1
日米3:1
日米6:1
日米10:1
日米0:1
100 10 1 100 10 1 100 10 1 100 10 1 20 7
mAb之濃度 (nM)

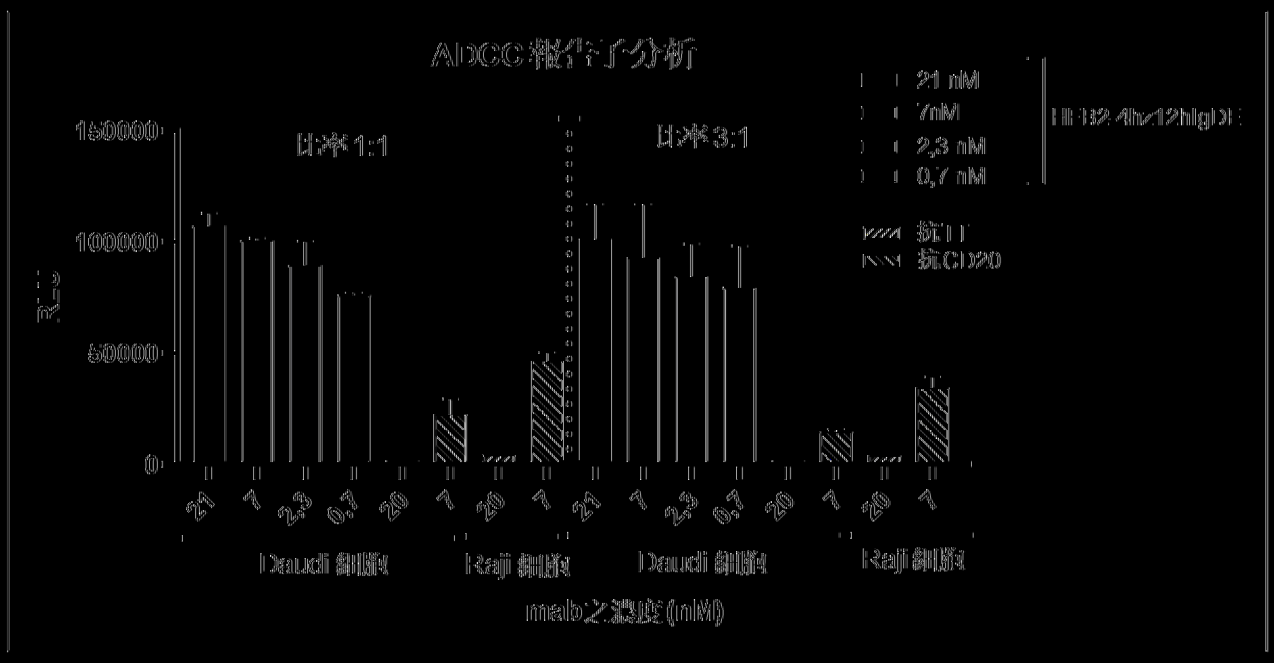
[(圖 13)]



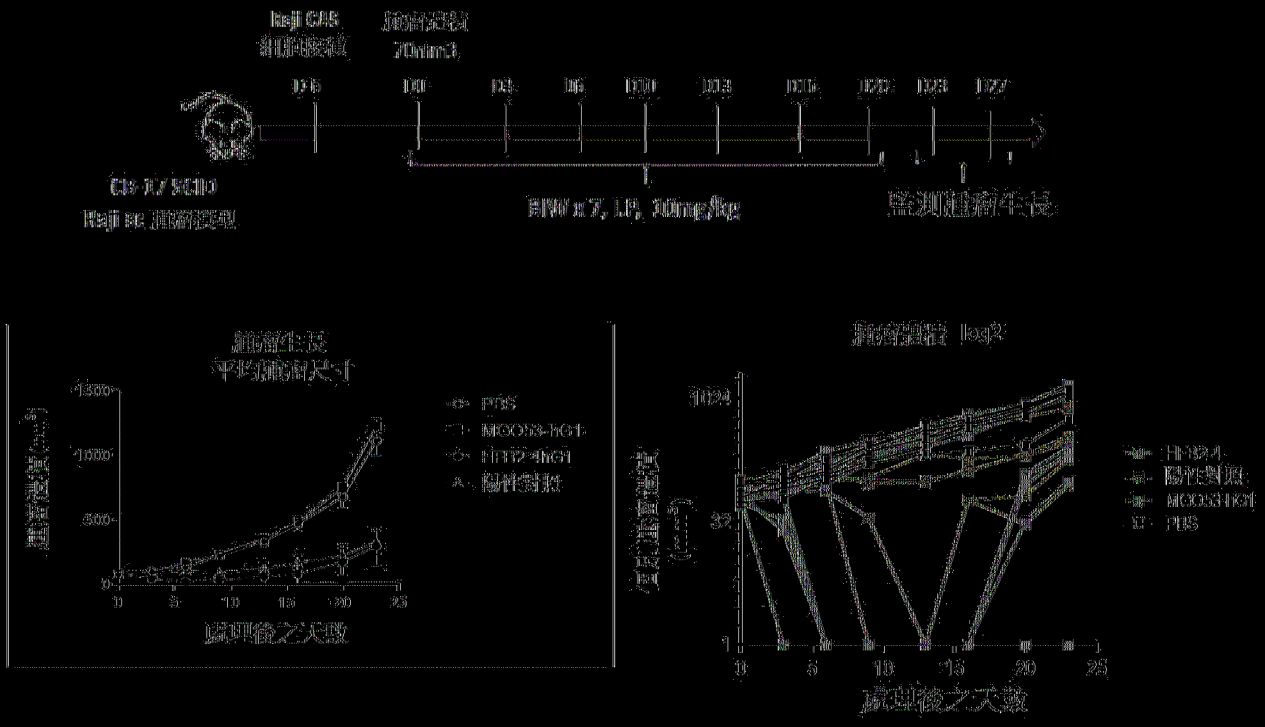
表現CD19之細胞株
(其於文獻)

- SW620, 結腸癌
- NCI-N87 胃癌
- KatoIII 胃癌癌
- PC3, 前列腺腺癌
- LNCaP, 前列腺癌
- MCF-, 乳癌
- Raji, 伯基特氏淋巴瘤
- Daudi, 伯基特氏淋巴瘤

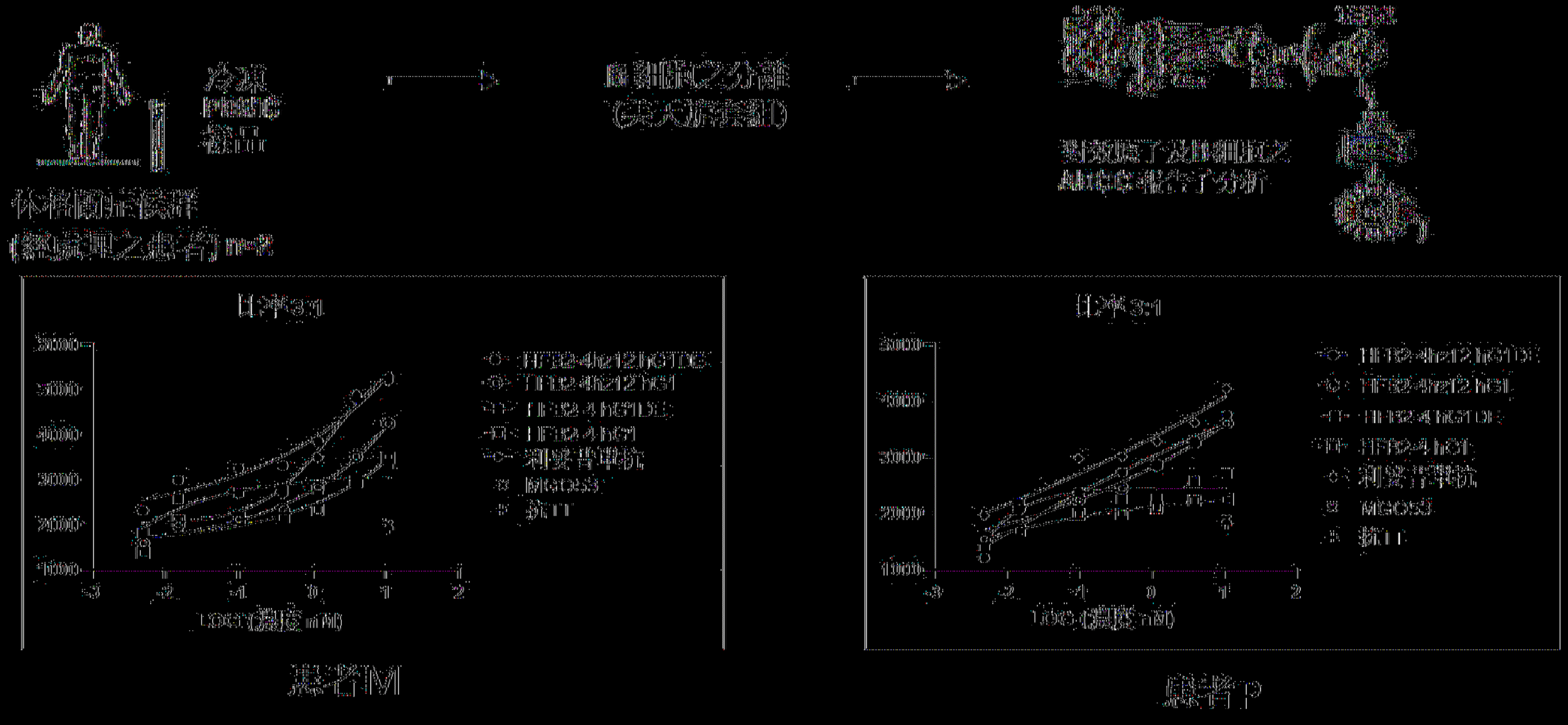
[(圖 14)]


ADCC殺伝ﾁｰﾝ分析
E:T 1:1
E:T 3:1
21 nM
7nM
2.3 nM
0.7 nM
ﾀｰｹﾞｯﾄ:24hr/12hrIgDH
抗TF
抗CD20
150000
100000
50000
0
Daudi 細胞
Raji 細胞
Daudi 細胞
Raji 細胞
mab2濃度(nM)

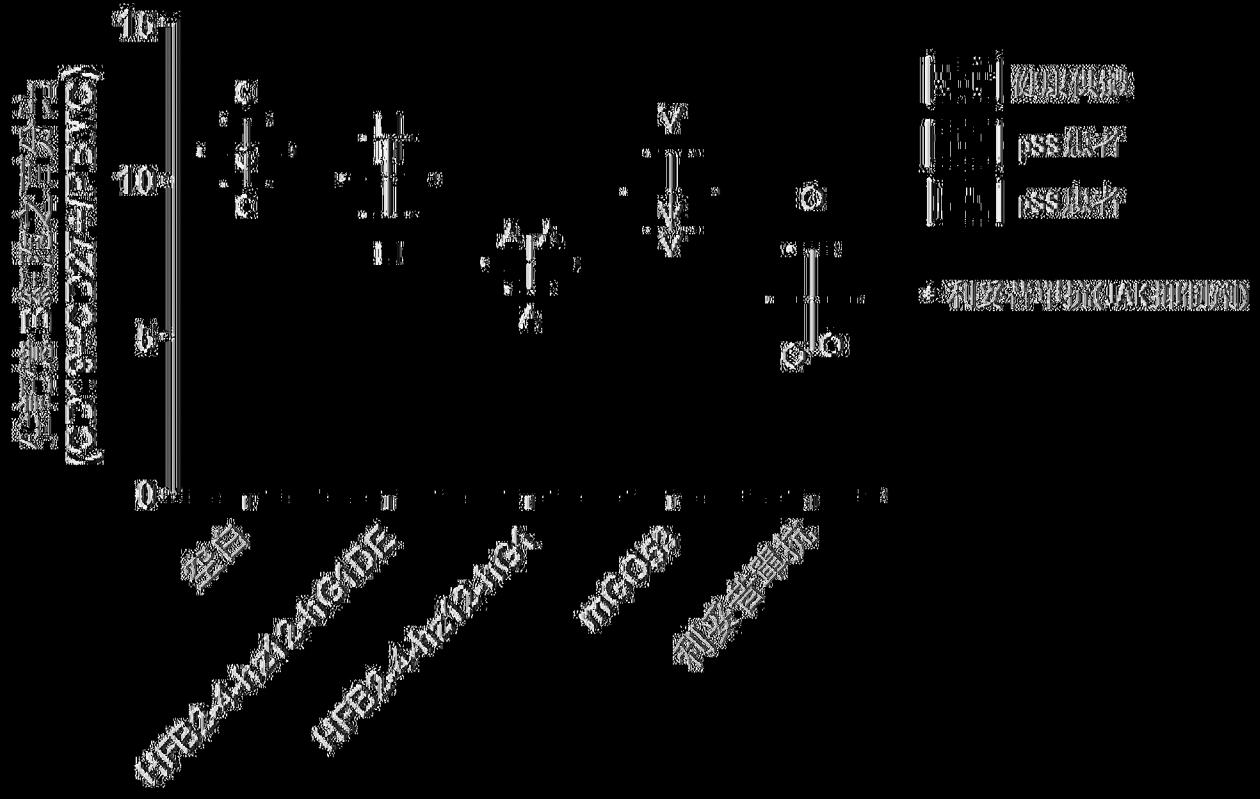
[図 15]

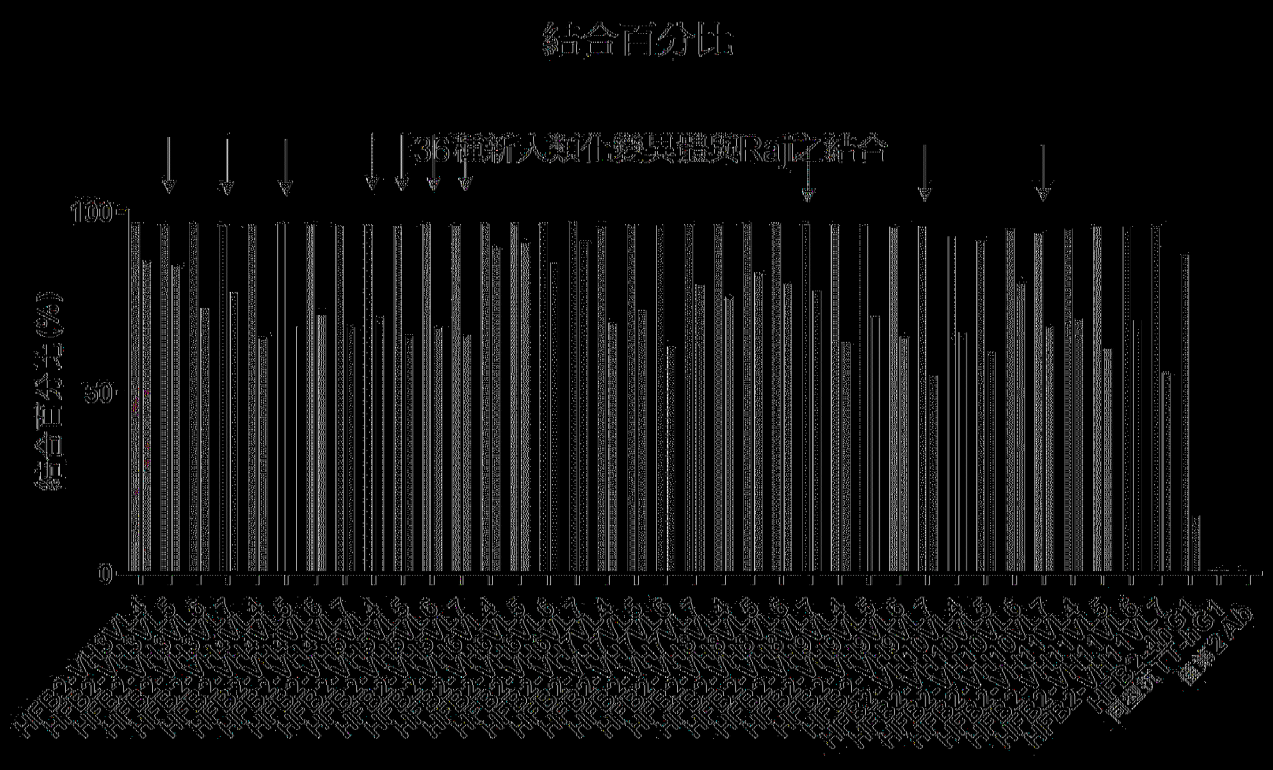

Huh7.5/SCID
Huh7.5 腫瘤模型
腫瘤體積
~70mm3
D-5
D0
D3
D5
D10
D13
D16
D17
D20
D27
D0-D27, IP, 30mg/kg
監測腫瘤生長
腫瘤生長
平均腫瘤大小
腫瘤體積 (mm3)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
試驗後之天數
PBS
MCC950+HG1
HTD2+HG1
HTD2
病毒負荷
病毒滴度 log10
1024
32
1
試驗後之天數
HTD2
HTD2+
MCC950+HG1
PBS

[(圖 16)]


冷凍
PBMC
樣品
B細胞之分離
患者M
患者P
HFB2-4hz12 hG1DE
HFB2-4hz12 hG1
HFB2-4 hG1DE
HFB2-4 hG1
利妥昔單抗
MGO53
緩衝
LOG(濃度 nM)

(圖17)

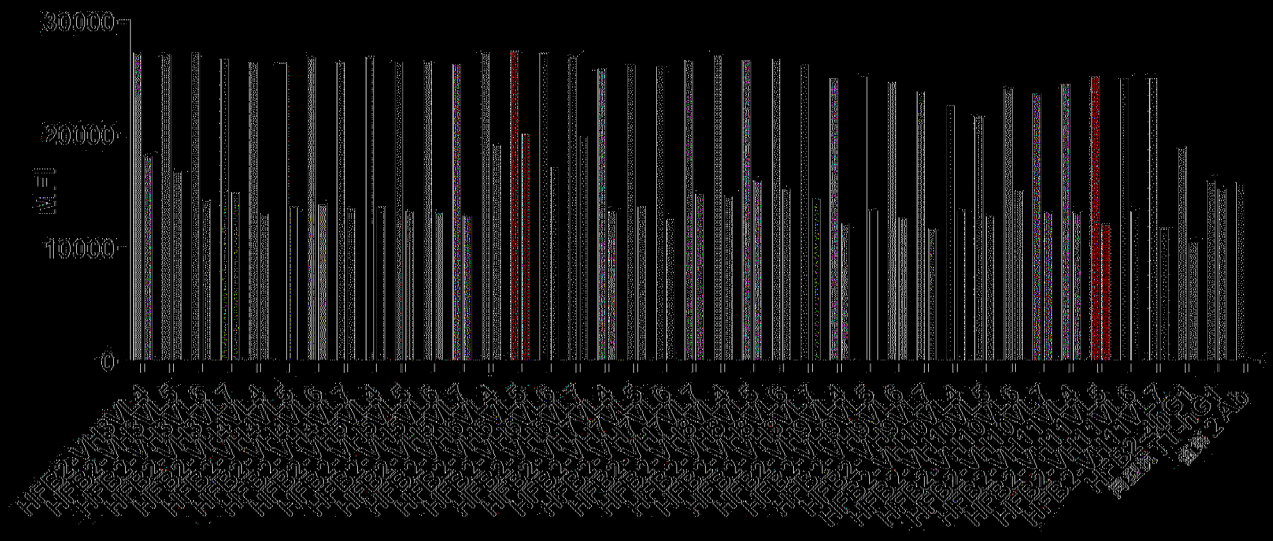

16
10
6
0
第一
第二
第三
第四
第五
第六
第七
第八
第九
第十
第十一
第十二
第十三
第十四
第十五
第十六
第十七
第十八
第十九
第二十
第二十一
第二十二
第二十三
第二十四
第二十五
第二十六
第二十七
第二十八
第二十九
第三十
第三十一
第三十二
第三十三
第三十四
第三十五
第三十六
第三十七
第三十八
第三十九
第四十
第四十一
第四十二
第四十三
第四十四
第四十五
第四十六
第四十七
第四十八
第四十九
第五十
第五十一
第五十二
第五十三
第五十四
第五十五
第五十六
第五十七
第五十八
第五十九
第六十
第六十一
第六十二
第六十三
第六十四
第六十五
第六十六
第六十七
第六十八
第六十九
第七十
第七十一
第七十二
第七十三
第七十四
第七十五
第七十六
第七十七
第七十八
第七十九
第八十
第八十一
第八十二
第八十三
第八十四
第八十五
第八十六
第八十七
第八十八
第八十九
第九十
第九十一
第九十二
第九十三
第九十四
第九十五
第九十六
第九十七
第九十八
第九十九
第一百
第一百一
第一百二
第一百三
第一百四
第一百五
第一百六
第一百七
第一百八
第一百九
第一百十
第一百十一
第一百十二
第一百十三
第一百十四
第一百十五
第一百十六
第一百十七
第一百十八
第一百十九
第一百二十
第一百二十一
第一百二十二
第一百二十三
第一百二十四
第一百二十五
第一百二十六
第一百二十七
第一百二十八
第一百二十九
第一百三十
第一百三十一
第一百三十二
第一百三十三
第一百三十四
第一百三十五
第一百三十六
第一百三十七
第一百三十八
第一百三十九
第一百四十
第一百四十一
第一百四十二
第一百四十三
第一百四十四
第一百四十五
第一百四十六
第一百四十七
第一百四十八
第一百四十九
第一百五十
第一百五十一
第一百五十二
第一百五十三
第一百五十四
第一百五十五
第一百五十六
第一百五十七
第一百五十八
第一百五十九
第一百六十
第一百六十一
第一百六十二
第一百六十三
第一百六十四
第一百六十五
第一百六十六
第一百六十七
第一百六十八
第一百六十九
第一百七十
第一百七十一
第一百七十二
第一百七十三
第一百七十四
第一百七十五
第一百七十六
第一百七十七
第一百七十八
第一百七十九
第一百八十
第一百八十一
第一百八十二
第一百八十三
第一百八十四
第一百八十五
第一百八十六
第一百八十七
第一百八十八
第一百八十九
第一百九十
第一百九十一
第一百九十二
第一百九十三
第一百九十四
第一百九十五
第一百九十六
第一百九十七
第一百九十八
第一百九十九
第二百
第二百一
第二百二
第二百三
第二百四
第二百五
第二百六
第二百七
第二百八
第二百九
第二百十
第二百十一
第二百十二
第二百十三
第二百十四
第二百十五
第二百十六
第二百十七
第二百十八
第二百十九
第二百二十
第二百二十一
第二百二十二
第二百二十三
第二百二十四
第二百二十五
第二百二十六
第二百二十七
第二百二十八
第二百二十九
第二百三十
第二百三十一
第二百三十二
第二百三十三
第二百三十四
第二百三十五
第二百三十六
第二百三十七
第二百三十八
第二百三十九
第二百四十
第二百四十一
第二百四十二
第二百四十三
第二百四十四
第二百四十五
第二百四十六
第二百四十七
第二百四十八
第二百四十九
第二百五十
第二百五十一
第二百五十二
第二百五十三
第二百五十四
第二百五十五
第二百五十六
第二百五十七
第二百五十八
第二百五十九
第二百六十
第二百六十一
第二百六十二
第二百六十三
第二百六十四
第二百六十五
第二百六十六
第二百六十七
第二百六十八
第二百六十九
第二百七十
第二百七十一
第二百七十二
第二百七十三
第二百七十四
第二百七十五
第二百七十六
第二百七十七
第二百七十八
第二百七十九
第二百八十
第二百八十一
第二百八十二
第二百八十三
第二百八十四
第二百八十五
第二百八十六
第二百八十七
第二百八十八
第二百八十九
第二百九十
第二百九十一
第二百九十二
第二百九十三
第二百九十四
第二百九十五
第二百九十六
第二百九十七
第二百九十八
第二百九十九
第三百
第三百一
第三百二
第三百三
第三百四
第三百五
第三百六
第三百七
第三百八
第三百九
第三百十
第三百十一
第三百十二
第三百十三
第三百十四
第三百十五
第三百十六
第三百十七
第三百十八
第三百十九
第三百二十
第三百二十一
第三百二十二
第三百二十三
第三百二十四
第三百二十五
第三百二十六
第三百二十七
第三百二十八
第三百二十九
第三百三十
第三百三十一
第三百三十二
第三百三十三
第三百三十四
第三百三十五
第三百三十六
第三百三十七
第三百三十八
第三百三十九
第三百四十
第三百四十一
第三百四十二
第三百四十三
第三百四十四
第三百四十五
第三百四十六
第三百四十七
第三百四十八
第三百四十九
第三百五十
第三百五十一
第三百五十二
第三百五十三
第三百五十四
第三百五十五
第三百五十六
第三百五十七
第三百五十八
第三百五十九
第三百六十
第三百六十一
第三百六十二
第三百六十三
第三百六十四
第三百六十五
第三百六十六
第三百六十七
第三百六十八
第三百六十九
第三百七十
第三百七十一
第三百七十二
第三百七十三
第三百七十四
第三百七十五
第三百七十六
第三百七十七
第三百七十八
第三百七十九
第三百八十
第三百八十一
第三百八十二
第三百八十三
第三百八十四
第三百八十五
第三百八十六
第三百八十七
第三百八十八
第三百八十九
第三百九十
第三百九十一
第三百九十二
第三百九十三
第三百九十四
第三百九十五
第三百九十六
第三百九十七
第三百九十八
第三百九十九
第四百
第四百一
第四百二
第四百三
第四百四
第四百五
第四百六
第四百七
第四百八
第四百九
第四百十
第四百十一
第四百十二
第四百十三
第四百十四
第四百十五
第四百十六
第四百十七
第四百十八
第四百十九
第四百二十
第四百二十一
第四百二十二
第四百二十三
第四百二十四
第四百二十五
第四百二十六
第四百二十七
第四百二十八
第四百二十九
第四百三十
第四百三十一
第四百三十二
第四百三十三
第四百三十四
第四百三十五
第四百三十六
第四百三十七
第四百三十八
第四百三十九
第四百四十
第四百四十一
第四百四十二
第四百四十三
第四百四十四
第四百四十五
第四百四十六
第四百四十七
第四百四十八
第四百四十九
第四百五十
第四百五十一
第四百五十二
第四百五十三
第四百五十四
第四百五十五
第四百五十六
第四百五十七
第四百五十八
第四百五十九
第四百六十
第四百六十一
第四百六十二
第四百六十三
第四百六十四
第四百六十五
第四百六十六
第四百六十七
第四百六十八
第四百六十九
第四百七十
第四百七十一
第四百七十二
第四百七十三
第四百七十四
第四百七十五
第四百七十六
第四百七十七
第四百七十八
第四百七十九
第四百八十
第四百八十一
第四百八十二
第四百八十三
第四百八十四
第四百八十五
第四百八十六
第四百八十七
第四百八十八
第四百八十九
第四百九十
第四百九十一
第四百九十二
第四百九十三
第四百九十四
第四百九十五
第四百九十六
第四百九十七
第四百九十八
第四百九十九
第五百
第五百一
第五百二
第五百三
第五百四
第五百五
第五百六
第五百七
第五百八
第五百九
第五百十
第五百十一
第五百十二
第五百十三
第五百十四
第五百十五
第五百十六
第五百十七
第五百十八
第五百十九
第五百二十
第五百二十一
第五百二十二
第五百二十三
第五百二十四
第五百二十五
第五百二十六
第五百二十七
第五百二十八
第五百二十九
第五百三十
第五百三十一
第五百三十二
第五百三十三
第五百三十四
第五百三十五
第五百三十六
第五百三十七
第五百三十八
第五百三十九
第五百四十
第五百四十一
第五百四十二
第五百四十三
第五百四十四
第五百四十五
第五百四十六
第五百四十七
第五百四十八
第五百四十九
第五百五十
第五百五十一
第五百五十二
第五百五十三
第五百五十四
第五百五十五
第五百五十六
第五百五十七
第五百五十八
第五百五十九
第五百六十
第五百六十一
第五百六十二
第五百六十三
第五百六十四
第五百六十五
第五百六十六
第五百六十七
第五百六十八
第五百六十九
第五百七十
第五百七十一
第五百七十二
第五百七十三
第五百七十四
第五百七十五
第五百七十六
第五百七十七
第五百七十八
第五百七十九
第五百八十
第五百八十一
第五百八十二
第五百八十三
第五百八十四
第五百八十五
第五百八十六
第五百八十七
第五百八十八
第五百八十九
第五百九十
第五百九十一
第五百九十二
第五百九十三
第五百九十四
第五百九十五
第五百九十六
第五百九十七
第五百九十八
第五百九十九
第六百
第六百一
第六百二
第六百三
第六百四
第六百五
第六百六
第六百七
第六百八
第六百九
第六百十
第六百十一
第六百十二
第六百十三
第六百十四
第六百十五
第六百十六
第六百十七
第六百十八
第六百十九
第六百二十
第六百二十一
第六百二十二
第六百二十三
第六百二十四
第六百二十五
第六百二十六
第六百二十七
第六百二十八
第六百二十九
第六百三十
第六百三十一
第六百三十二
第六百三十三
第六百三十四
第六百三十五
第六百三十六
第六百三十七
第六百三十八
第六百三十九
第六百四十
第六百四十一
第六百四十二
第六百四十三
第六百四十四
第六百四十五
第六百四十六
第六百四十七
第六百四十八
第六百四十九
第六百五十
第六百五十一
第六百五十二
第六百五十三
第六百五十四
第六百五十五
第六百五十六
第六百五十七
第六百五十八
第六百五十九
第六百六十
第六百六十一
第六百六十二
第六百六十三
第六百六十四
第六百六十五
第六百六十六
第六百六十七
第六百六十八
第六百六十九
第六百七十
第六百七十一
第六百七十二
第六百七十三
第六百七十四
第六百七十五
第六百七十六
第六百七十七
第六百七十八
第六百七十九
第六百八十
第六百八十一
第六百八十二
第六百八十三
第六百八十四
第六百八十五
第六百八十六
第六百八十七
第六百八十八
第六百八十九
第六百九十
第六百九十一
第六百九十二
第六百九十三
第六百九十四
第六百九十五
第六百九十六
第六百九十七
第六百九十八
第六百九十九
第七百
第七百一
第七百二
第七百三
第七百四
第七百五
第七百六
第七百七
第七百八
第七百九
第七百十
第七百十一
第七百十二
第七百十三
第七百十四
第七百十五
第七百十六
第七百十七
第七百十八
第七百十九
第七百二十
第七百二十一
第七百二十二
第七百二十三
第七百二十四
第七百二十五
第七百二十六
第七百二十七
第七百二十八
第七百二十九
第七百三十
第七百三十一
第七百三十二
第七百三十三
第七百三十四
第七百三十五
第七百三十六
第七百三十七
第七百三十八
第七百三十九
第七百四十
第七百四十一
第七百四十二
第七百四十三
第七百四十四
第七百四十五
第七百四十六
第七百四十七
第七百四十八
第七百四十九
第七百五十
第七百五十一
第七百五十二
第七百五十三
第七百五十四
第七百五十五
第七百五十六
第七百五十七
第七百五十八
第七百五十九
第七百六十
第七百六十一
第七百六十二
第七百六十三
第七百六十四
第七百六十五
第七百六十六
第七百六十七
第七百六十八
第七百六十九
第七百七十
第七百七十一
第七百七十二
第七百七十三
第七百七十四
第七百七十五
第七百七十六
第七百七十七
第七百七十八
第七百七十九
第七百八十
第七百八十一
第七百八十二
第七百八十三
第七百八十四
第七百八十五
第七百八十六
第七百八十七
第七百八十八
第七百八十九
第七百九十
第七百九十一
第七百九十二
第七百九十三
第七百九十四
第七百九十五
第七百九十六
第七百九十七
第七百九十八
第七百九十九
第八百
第八百一
第八百二
第八百三
第八百四
第八百五
第八百六
第八百七
第八百八
第八百九
第八百十
第八百十一
第八百十二
第八百十三
第八百十四
第八百十五
第八百十六
第八百十七
第八百十八
第八百十九
第八百二十
第八百二十一
第八百二十二
第八百二十三
第八百二十四
第八百二十五
第八百二十六
第八百二十七
第八百二十八
第八百二十九
第八百三十
第八百三十一
第八百三十二
第八百三十三
第八百三十四
第八百三十五
第八百三十六
第八百三十七
第八百三十八
第八百三十九
第八百四十
第八百四十一
第八百四十二
第八百四十三
第八百四十四
第八百四十五
第八百四十六
第八百四十七
第八百四十八
第八百四十九
第八百五十
第八百五十一
第八百五十二
第八百五十三
第八百五十四
第八百五十五
第八百五十六
第八百五十七
第八百五十八
第八百五十九
第八百六十
第八百六十一
第八百六十二
第八百六十三
第八百六十四
第八百六十五
第八百六十六
第八百六十七
第八百六十八
第八百六十九
第八百七十
第八百七十一
第八百七十二
第八百七十三
第八百七十四
第八百七十五
第八百七十六
第八百七十七
第八百七十八
第八百七十九
第八百八十
第八百八十一
第八百八十二
第八百八十三
第八百八十四
第八百八十五
第八百八十六
第八百八十七
第八百八十八
第八百八十九
第八百九十
第八百九十一
第八百九十二
第八百九十三
第八百九十四
第八百九十五
第八百九十六
第八百九十七
第八百九十八
第八百九十九
第九百
第九百一
第九百二
第九百三
第九百四
第九百五
第九百六
第九百七
第九百八
第九百九
第九百十
第九百十一
第九百十二
第九百十三
第九百十四
第九百十五
第九百十六
第九百十七
第九百十八
第九百十九
第九百二十
第九百二十一
第九百二十二
第九百二十三
第九百二十四
第九百二十五
第九百二十六
第九百二十七
第九百二十八
第九百二十九
第九百三十
第九百三十一
第九百三十二
第九百三十三
第九百三十四
第九百三十五
第九百三十六
第九百三十七
第九百三十八
第九百三十九
第九百四十
第九百四十一
第九百四十二
第九百四十三
第九百四十四
第九百四十五
第九百四十六
第九百四十七
第九百四十八
第九百四十九
第九百五十
第九百五十一
第九百五十二
第九百五十三
第九百五十四
第九百五十五
第九百五十六
第九百五十七
第九百五十八
第九百五十九
第九百六十
第九百六十一
第九百六十二
第九百六十三
第九百六十四
第九百六十五
第九百六十六
第九百六十七
第九百六十八
第九百六十九
第九百七十
第九百七十一
第九百七十二
第九百七十三
第九百七十四
第九百七十五
第九百七十六
第九百七十七
第九百七十八
第九百七十九
第九百八十
第九百八十一
第九百八十二
第九百八十三
第九百八十四
第九百八十五
第九百八十六
第九百八十七
第九百八十八
第九百八十九
第九百九十
第九百九十一
第九百九十二
第九百九十三
第九百九十四
第九百九十五
第九百九十六
第九百九十七
第九百九十八
第九百九十九
第一千
第一千一
第一千二
第一千三
第一千四
第一千五
第一千六
第一千七
第一千八
第一千九
第一千十
第一千十一
第一千十二
第一千十三
第一千十四
第一千十五
第一千十六
第一千十七
第一千十八
第一千十九
第一千二十
第一千二十一
第一千二十二
第一千二十三
第一千二十四
第一千二十五
第一千二十六
第一千二十七
第一千二十八
第一千二十九
第一千三十
第一千三十一
第一千三十二
第一千三十三
第一千三十四
第一千三十五
第一千三十六
第一千三十七
第一千三十八
第一千三十九
第一千四十
第一千四十一
第一千四十二
第一千四十三
第一千四十四
第一千四十五
第一千四十六
第一千四十七
第一千四十八
第一千四十九
第一千五十
第一千五十一
第一千五十二
第一千五十三
第一千五十四
第一千五十五
第一千五十六
第一千五十七
第一千五十八
第一千五十九
第一千六十
第一千六十一
第一千六十二
第一千六十三
第一千六十四
第一千六十五
第一千六十六
第一千六十七
第一千六十八
第一千六十九
第一千七十
第一千七十一
第一千七十二
第一千七十三
第一千七十四
第一千七十五
第一千七十六
第一千七十七
第一千七十八
第一千七十九
第一千八十
第一千八十一
第一千八十二
第一千八十三
第一千八十四
第一千八十五
第一千八十六
第一千八十七
第一千八十八
第一千八十九
第一千九十
第一千九十一
第一千九十二
第一千九十三
第一千九十四
第一千九十五
第一千九十六
第一千九十七
第一千九十八
第一千九十九
第一千一百
第一千一百一
第一千一百二
第一千一百三
第一千一百四
第一千一百五
第一千一百六
第一千一百七
第一千一百八
第一千一百九
第一千一百十
第一千一百十一
第一千一百十二
第一千一百十三
第一千一百十四
第一千一百十五
第一千一百十六
第一千一百十七
第一千一百十八
第一千一百十九
第一千一百二十
第一千一百二十一
第一千一百二十二
第一千一百二十三
第一千一百二十四
第一千一百二十五
第一千一百二十六
第一千一百二十七
第一千一百二十八
第一千一百二十九
第一千一百三十
第一千一百三十一
第一千一百三十二
第一千一百三十三
第一千一百三十四
第一千一百三十五
第一千一百三十六
第一千一百三十七
第一千一百三十八
第一千一百三十九
第一千一百四十
第一千一百四十一
第一千一百四十二
第一千一百四十三
第一千一百四十四
第一千一百四十五
第一千一百四十六
第一千一百四十七
第一千一百四十八
第一千一百四十九
第一千一百五十
第一千一百五十一
第一千一百五十二
第一千一百五十三
第一千一百五十四
第一千一百五十五
第一千一百五十六
第一千一百五十七
第一千一百五十八
第一千一百五十九
第一千一百六十
第一千一百六十一
第一千一百六十二
第一千一百六十三
第一千一百六十四
第一千一百六十五
第一千一百六十六
第一千一百六十七
第一千一百六十八
第一千一百六十九
第一千一百七十
第一千一百七十一
第一千一百七十二
第一千一百七十三
第一千一百七十四
第一千一百七十五
第一千一百七十六
第一千一百七十七
第一千一百七十八
第一千一百七十九
第一千一百八十
第一千一百八十一
第一千一百八十二
第一千一百八十三
第一千一百八十四
第一千一百八十五
第一千一百八十六
第一千一百八十七
第一千一百八十八
第一千一百八十九
第一千一百九十
第一千一百九十一
第一千一百九十二
第一千一百九十三
第一千一百九十四
第一千一百九十五
第一千一百九十六
第一千一百九十七
第一千一百九十八
第一千一百九十九
第一千二百
第一千二百一
第一千二百二
第一千二百三
第一千二百四
第一千二百五
第一千二百六
第一千二百七
第一千二百八
第一千二百九
第一千二百十
第一千二百十一
第一千二百十二
第一千二百十三
第一千二百十四
第一千二百十五
第一千二百十六
第一千二百十七
第一千二百十八
第一千二百十九
第一千二百二十
第一千二百二十一
第一千二百二十二
第一千二百二十三
第一千二百二十四
第一千二百二十五
第一千二百二十六
第一千二百二十七
第一千二百二十八
第一千二百二十九
第一千二百三十
第一千二百三十一
第一千二百三十二
第一千二百三十三
第一千二百三十四
第一千二百三十五
第一千二百三十六
第一千二百三十七
第一千二百三十八
第一千二百三十九
第一千二百四十
第一千二百四十一
第一千二百四十二
第一千二百四十三
第一千二百四十四
第一千二百四十五
第一千二百四十六
第一千二百四十七
第一千二百四十八
第一千二百四十九
第一千二百五十
第一千二百五十一
第一千二百五十二
第一千二百五十三
第一千二百五十四
第一千二百五十五
第一千二百五十六
第一千二百五十七
第一千二百五十八
第一千二百五十九
第一千二百六十
第一千二百六十一
第一千二百六十二
第一千二百六十三
第一千二百六十四
第一千二百六十五
第一千二百六十六
第一千二百六十七
第一千二百六十八
第一千二百六十九
第一千二百七十
第一千二百七十一
第一千二百七十二
第一千二百七十三
第一千二百七十四
第一千二百七十五
第一千二百七十六
第一千二百七十七
第一千二百七十八
第一千二百七十九
第一千二百八十
第一千二百八十一
第一千二百八十二
第一千二百八十三
第一千二百八十四
第一千二百八十五
第一千二百八十六
第一千二百八十七
第一千二百八十八
第一千二百八十九
第一千二百九十
第一千二百九十一
第一千二百九十二
第一千二百九十三
第一千二百九十四
第一千二百九十五
第一千二百九十六
第一千二百九十七
第一千二百九十八
第一千二百九十九
第一千三百
第一千三百一
第一千三百二
第一千三百三
第一千三百四
第一千三百五
第一千三百六
第一千三百七
第一千三百八
第一千三百九
第一千三百十
第一千三百十一
第一千三百十二
第一千三百十三
第一千三百十四
第一千三百十五
第一千三百十六
第一千三百十七
第一千三百十八
第一千三百十九
第一千三百二十
第一千三百二十一
第一千三百二十二
第一千三百二十三
第一千三百二十四
第一千三百二十五
第一千三百二十六
第一千三百二十七
第一千三百二十八
第一千三百二十九
第一千三百三十
第一千三百三十一
第一千三百三十二
第一千三百三十三
第一千三百三十四
第一千三百三十五
第一千三百三十六
第一千三百三十七
第一千三百三十八
第一千三百三十九
第一千三百四十
第一千三百四十一
第一千三百四十二
第一千三百四十三
第一千三百四十四
第一千三百四十五
第一千三百四十六
第一千三百四十七
第一千三百四十八
第一千三百四十九
第一千三百五十
第一千三百五十一
第一千三百五十二
第一千三百五十三
第一千三百五十四
第一千三百五十五
第一千三百五十六
第一千三百五十七
第一千三百五十八
第一千三百五十九
第一千三百六十
第一千三百六十一
第一千三百六十二
第一千三百六十三
第一千三百六十四
第一千三百六十五
第一千三百六十六
第一千三百六十七
第一千三百六十八
第一千三百六十九
第一千三百七十
第一千三百七十一
第一千三百七十二
第一千三百七十三
第一千三百七十四
第一千三百七十五
第一千三百七十六
第一千三百七十七
第一千三百七十八
第一千三百七十九
第一千三百八十
第一千三百八十一
第一千三百八十二
第一千三百八十三
第一千三百八十四
第一千三百八十五
第一千三百八十六
第一千三百八十七
第一千三百八十八
第一千三百八十九
第一千三百九十
第一千三百九十一
第一千三百九十二
第一千三百九十三
第一千三百九十四
第一千三百九十五
第一千三百九十六
第一千三百九十七
第一千三百九十八
第一千三百九十九
第一千四百
第一千四百一
第一千四百二
第一千四百三
第一千四百四
第一千四百五
第一千四百六
第一千四百七
第一千四百八
第一千四百九
第一千四百十
第一千四百十一
第一千四百十二
第一千四百十三
第一千四百十四
第一千四百十五
第一千四百十六
第一千四百十七
第一千四百十八
第一千四百十九
第一千四百二十
第一千四百二十一
第一千四百二十二
第一千四百二十三
第一千四百二十四
第一千四百二十五
第一千四百二十六
第一千四百二十七
第一千四百二十八
第一千四百二十九
第一千四百三十
第一千四百三十一
第一千四百三十二
第一千四百三十三
第一千四百三十四
第一千四百三十五
第一千四百三十六
第一千四百三十七
第一千四百三十八
第一千四百三十九
第一千四百四十
第一千四百四十一
第一千四百四十二
第一千四百四十三
第一千四百四十四
第一千四百四十五
第一千四百四十六
第一千四百四十七
第一千四百四十八
第一千四百四十九
第一千四百五十
第一千四百五十一
第一千四百五十二
第一千四百五十三
第一千四百五十四
第一千四百五十五
第一千四百五十六
第一千四百五十七
第一千四百五十八
第一千四百五十九
第一千四百六十
第一千四百六十一
第一千四百六十二
第一千四百六十三
第一千四百六十四
第一千四百六十五
第一千四百六十六
第一千四百六十七
第一千四百六十八
第一千四百六十九
第一千四百七十
第一千四百七十一
第一千四百七十二
第一千四百七十三
第一千四百七十四
第一千四百七十五
第一千四百七十六
第一千四百七十七
第一千四百七十八
第一千四百七十九
第一千四百八十
第一千四百八十一
第一千四百八十二
第一千四百八十三
第一千四百八十四
第一千四百八十五
第一千四百八十六
第一千四百八十七
第一千四百八十八
第一千四百八十九
第一千四百九十
第一千四百九十一
第一千四百九十二
第一千四百九十三
第一千四百九十四
第一千四百九十五
第一千四百九十六
第一千四百九十七
第一千四百九十八
第一千四百九十九
第一千五百
第一千五百一
第一千五百二
第一千五百三
第一千五百四
第一千五百五
第一千五百六
第一千五百七
第一千五百八
第一千五百九
第一千五百十
第一千五百十一
第一千五百十二
第一千五百十三
第一千五百十四
第一千五百十五
第一千五百十六
第一千五百十七
第一千五百十八
第一千五百十九
第一千五百二十
第一千五百二十一
第一千五百二十二
第一千五百二十三
第一千五百二十四
第一千五百二十五
第一千五百二十六
第一千五百二十七
第一千五百二十八
第一千五百二十九
第一千五百三十
第一千五百三十一
第一千五百三十二
第一千五百三十三
第一千五百三十四
第一千五百三十五
第一千五百三十六
第一千五百三十七
第一千五百三十八
第一千五百三十九
第一千五百四十
第一千五百四十一
第一千五百四十二
第一千五百四十三
第一千五百四十四
第一千五百四十五
第一千五百四十六
第一千五百四十七
第一千五百四十八
第一千五百四十九
第一千五百五十
第一千五百五十一
第一千五百五十二
第一千五百五十三
第一千五百五十四
第一千五百五十五
第一千五百五十六
第一千五百五十七
第一千五百五十八
第一千五百五十九
第一千五百六十
第一千五百六十一
第一千五百六十二
第一千五百六十三
第一千五百六十四
第一千五百六十五
第一千五百六十六
第一千五百六十七
第一千五百六十八
第一千五百六十九
第一千五百七十
第一千五百七十一
第一千五百七十二
第一千五百七十三
第一千五百七十四
第一千五百七十五
第一千五百七十六
第一千五百七十七
第一千五百七十八
第一千五百七十九
第一千五百八十
第一千五百八十一
第一千五百八十二
第一千五百八十三
第一千五百八十四
第一千五百八十五
第一千五百八十六
第一千五百八十七
第一千五百八十八
第一千五百八十九
第一千五百九十
第一千五百九十一
第一千五百九十二
第一千五百九十三
第一千五百九十四
第一千五百九十五
第一千五百九十六
第一千五百九十七
第一千五百九十八
第一千五百九十九
第一千六百
第一千六百一
第一千六百二
第一千六百三
第一千六百四
第一千六百五
第一千六百六
第一千六百七
第一千六百八
第一千六百九
第一千六百十
第一千六百十一
第一千六百十二
第一千六百十三
第一千六百十四
第一千六百十五
第一千六百十六
第一千六百十七
第一千六百十八
第一千六百十九
第一千六百二十
第一千六百二十一
第一千六百二十二
第一千六百二十三
第一千六百二十四
第一千六百二十五
第一千六百二十六
第一千六百二十七
第一千六百二十八
第一千六百二十九
第一千六百三十
第一千六百三十一
第一千六百三十二
第一千六百三十三
第一千六百三十四
第一千六百三十五
第一千六百三十六
第一千六百三十七
第一千六百三十八
第一千六百三十九
第一千六百四十
第一千六百四十一
第一千六百四十二
第一千六百四十三
第一千六百四十四
第一千六百四十五
第一千六百四十六
第一千六百四十七
第一千六百四十八
第一千六百四十九
第一千六百五十
第一千六百五十一
第一千六百五十二
第一千六百五十三
第一千六百五十四
第一千六百五十五
第一千六百五十六
第一千六百五十七
第一千六百五十八
第一千六百五十九
第一千六百六十
第一千六百六十一
第一千六百六十二
第一千六百六十三
第一千六百六十四
第一千六百六十五
第一千六百六十六
第一千六百六十七
第一千六百六十八
第一千六百六十九
第一千六百七十
第一千六百七十一
第一千六百七十二
第一千六百七十三
第一千六百七十四
第一千六百七十五
第一千六百七十六
第一千六百七十七
第一千六百七十八
第一千六百七十九
第一千六百八十
第一千六百八十一
第一千六百八十二
第一千六百八十三
第一千六百八十四
第一千六百八十五
第一千六百八十六
第一千六百八十七
第一千六百八十八
第一千六百八十九
第一千六百九十
第一千六百九十一
第一千六百九十二
第一千六百九十三
第一千六百九十四
第一千六百九十五
第一千六百九十六
第一千六百九十七
第一千六百九十八
第一千六百九十九
第一千七百
第一千七百一
第一千七百二
第一千七百三
第一千七百四
第一千七百五
第一千七百六
第一千七百七
第一千七百八
第一千七百九
第一千七百十
第一千七百十一
第一千七百十二
第一千七百十三
第一千七百十四
第一千七百十五
第一千七百十六
第一千七百十七
第一千七百十八
第一千七百十九
第一千七百二十
第一千七百二十一
第一千七百二十二
第一千七百二十三
第一千七百二十四
第一千七百二十五
第一千七百二十六
第一千七百二十七
第一千七百二十八
第一千七百二十九
第一千七百三十
第一千七百三十一
第一千七百三十二
第一千七百三十三
第一千七百三十四
第一千七百三十五
第一千七百三十六
第一千七百三十七
第一千七百三十八
第一千七百三十九
第一千七百四十
第一千七百四十一
第一千七百四十二
第一千七百四十三
第一千七百四十四
第一千七百四十五
第一千七百四十六
第一千七百四十七
第一千七百四十八
第一千七百四十九
第一千七百五十
第一千七百五十一
第一千七百五十二
第一千七百五十三
第一千七百五十四
第一千七百五十五
第一千七百五十六
第一千七百五十七
第一千七百五十八
第一千七百五十九
第一千七百六十
第一千七百六十一
第一千七百六十二
第一千七百六十三
第一千七百六十四
第一千七百六十五
第一千七百六十六
第一千七百六十七
第一千七百六十八
第一千七百六十九
第一千七百七十
第一千七百七十一
第一千七百七十二
第一千七百七十三
第一千七百七十四
第一千七百七十五
第一千七百七十六
第一千七百七十七
第一千七百七十八
第一千七百七十九
第一千七百八十
第一千七百八十一
第一千七百八十二
第一千七百八十三
第一千七百八十四
第一千七百八十五
第一千七百八十六
第一千七百八十七
第一千七百八十八
第一千七百八十九
第一千七百九十
第一千七百九十一
第一千七百九十二
第一千七百九十三
第一千七百九十四
第一千七百九十五
第一千七百九十六
第一千七百九十七
第一千七百九十八
第一千七百九十九
第一千八百
第一千八百一
第一千八百二
第一千八百三
第一千八百四
第一千八百五
第一千八百六
第一千八百七
第一千八百八
第一千八百九
第一千八百十
第一千八百十一
第一千八百十二
第一千八百十三
第一千八百十四
第一千八百十五
第一千八百十六
第一千八百十七
第一千八百十八
第一千八百十九
第一千八百二十
第一千八百二十一
第一千八百二十二
第一千八百二十三
第一千八百二十四
第一千八百二十五
第一千八百二十六
第一千八百二十七
第一千八百二十八
第一千八百二十九
第一千八百三十
第一千八百三十一
第一千八百三十二
第一千八百三十三
第一千八百三十四
第一千八百三十五
第一千八百三十六
第一千八百三十七
第一千八百三十八
第一千八百三十九
第一千八百四十
第一千八百四十一
第一千八百四十二
第一千八百四十三
第一千八百四十四
第一千八百四十五
第一千八百四十六
第一千八百四十七
第一千八百四十八
第一千八百四十九
第一千八百五十
第一千八百五十一
第一千八百五十二
第一千八百五十三
第一千八百五十四
第一千八百五十五
第一千八百五十六
第一千八百五十七
第一千八百五十八
第一千八百五十九
第一千八百六十
第一千八百六十一
第一千八百六十二
第一千八百六十三
第一千八百六十四
第一千八百六十五
第一千八百六十六
第一千八百六十七
第一千八百六十八
第一千八百六十九
第一千八百七十
第一千八百七十一
第一千八百七十二
第一千八百七十三
第一千八百七十四
第一千八百七十五
第一千八百七十六
第一千八百七十七
第一千八百七十八
第一千八百七十九
第一千八百八十
第一千八百八十一
第一千八百八十二
第一千八百八十三
第一千八百八十四
第一千八百八十五
第一千八百八十六
第一千八百八十七
第一千八百八十八
第一千八百八十九
第一千八百九十
第一千八百九十一
第一千八百九十二
第一千八百九十三
第一千八百九十四
第一千八百九十五
第一千八百九十六
第一千八百九十七
第一千八百九十八
第一千八百九十九
第一千九百
第一千九百一
第一千九百二
第一千九百三
第一千九百四
第一千九百五
第一千九百六
第一千九百七
第一千九百八
第一千九百九
第一千九百十
第一千九百十一
第一千九百十二
第一千九百十三
第一千九百十四
第一千九百十五
第一千九百十六
第一千九百十七
第一千九百十八
第一千九百十九
第一千九百二十
第一千九百二十一
第一千九百二十二
第一千九百二十三
第一千九百二十四
第一千九百二十五
第一千九百二十六
第一千九百二十七
第一千九百二十八
第一千九百二十九
第一千九百三十
第一千九百三十一
第一千九百三十二
第一千九百三十三
第一千九百三十四
第一千九百三十五
第一千九百三十六
第一千九百三十七
第一千九百三十八
第一千九百三十九
第一千九百四十
第一千九百四十一
第一千九百四十二
第一千九百四十三
第一千九百四十四
第一千九百四十五
第一千九百四十六
第一千九百四十七
第一千九百四十八
第一千九百四十九
第一千九百五十
第一千九百五十一
第一千九百五十二
第一千九百五十三
第一千九百五十四
第一千九百五十五
第一千九百五十六
第一千九百五十七
第一千九百五十八
第一千九百五十九
第一千九百六十
第一千九百六十一
第一千九百六十二
第一千九百六十三
第一千九百六十四
第一千九百六十五
第一千九百六十六
第一千九百六十七
第一千九百六十八
第一千九百六十九
第一千九百七十
第一千九百七十一
第一千九百七十二
第一千九百七十三
第一千九百七十四
第一千九百七十五
第一千九百七十六
第一千九百七十七
第一千九百七十八
第一千九百七十九
第一千九百八十
第一千九百八十一
第一千九百八十二
第一千九百八十三
第一千九百八十四
第一千九百八十五
第一千九百八十六
第一千九百八十七
第一千九百八十八
第一千九百八十九
第一千九百九十
第一千九百九十一
第一千九百九十二
第一千九百九十三
第一千九百九十四
第一千九百九十五
第一千九百九十六
第一千九百九十七
第一千九百九十八
第一千九百九十九
第二千
第二千一
第二千二
第二千三
第二千四
第二千五
第二千六
第二千七
第二千八
第二千九
第二千十
第二千十一
第二千十二
第二千十三
第二千十四
第二千十五
第二千十六
第二千十七
第二千十八
第二千十九
第二千二十
第二千二十一
第二千二十二
第二千二十三
第二千二十四
第二千二十五
第二千二十六
第二千二十七
第二千二十八
第二千二十九
第二千三十
第二千三十一
第二千三十二
第二千三十三
第二千三十四
第二千三十五
第二千三十六
第二千三十七
第二千三十八
第二千三十九
第二千四十
第二千四十一
第二千四十二
第二千四十三
第二千四十四
第二千四十五
第二千四十六
第二千四十七
第二千四十八
第二千四十九
第二千五十
第二千五十一
第二千五十二
第二千五十三
第二千五十四
第二千五十五
第二千五十六
第二千五十七
第二千五十八
第二千五十九
第二千六十
第二千六十一
第二千六十二
第二千六十三
第二千六十四
第二千六十五
第二千六十六
第二千六十七
第二千六十八
第二千六十九
第二千七十
第二千七十一
第二千七十二
第二千七十三
第二千七十四
第二千七十五
第二千七十六
第二千七十七
第二千七十八
第二千七十九
第二千八十
第二千八十一
第二千八十二
第二千八十三
第二千八十四
第二千八十五
第二千八十六
第二千八十七
第二千八十八
第二千八十九
第二千九十
第二千九十一
第二千九十二
第二千九十三
第二千九十四
第二千九十五
第二千九十六
第二千九十七
第二千九十八
第二千九十九
第二千一百
第二千一百一
第二千一百二
第二千一百三
第二千一百四
第二千一百五
第二千一百六
第二千一百七
第二千一百八
第二千一百九
第二千一百十
第二千一百十一
第二千一百十二
第二千一百十三
第二千一百十四
第二千一百十五
第二千一百十六
第二千一百十七
第二千一百十八
第二千一百十九
第二千一百二十
第二千一百二十一
第二千一百二十二
第二千一百二十三
第二千一百二十四
第二千一百二十五
第二千一百二十六
第二千一百二十七
第二千一百二十八
第二千一百二十九
第二千一百三十
第二千一百三十一
第二千一百三十二
第二千一百三十三
第二千一百三十四
第二千一百三十五
第二千一百三十六
第二千一百三十七
第二千一百三十八
第二千一百三十九
第二千一百四十
第二千一百四十一
第二千一百四十二
第二千一百四十三
第二千一百四十四
第二千一百四十五
第二千一百四十六
第二千一百四十七
第二千一百四十八
第二千一百四十九
第二千一百五十
第二千一百五十一
第二千一百五十二
第二千一百五十三
第二


結合百分比
36種新入選作製異體致Raf之結合
100
50
0
HEK293細胞結合(%)
Ab濃度為1nM及0.1nM

[圖 19A]

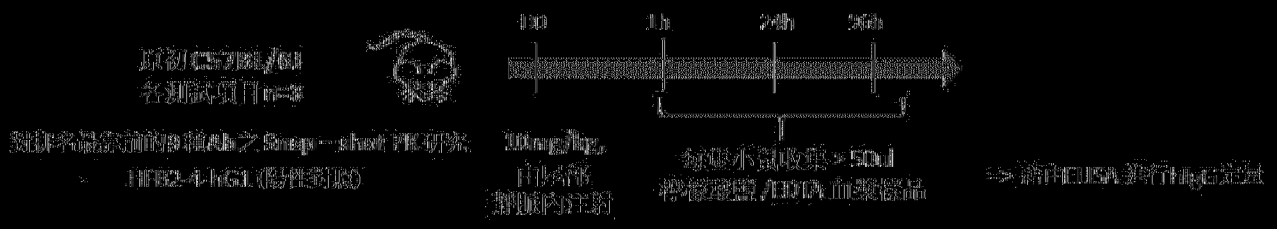
平均螢光強度

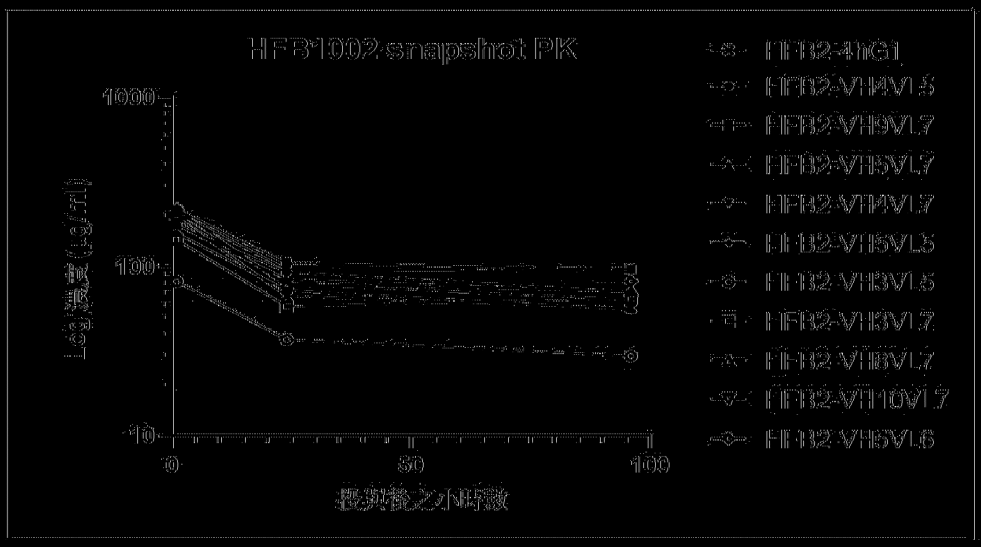
38種新人類作參與體與Raji之結合



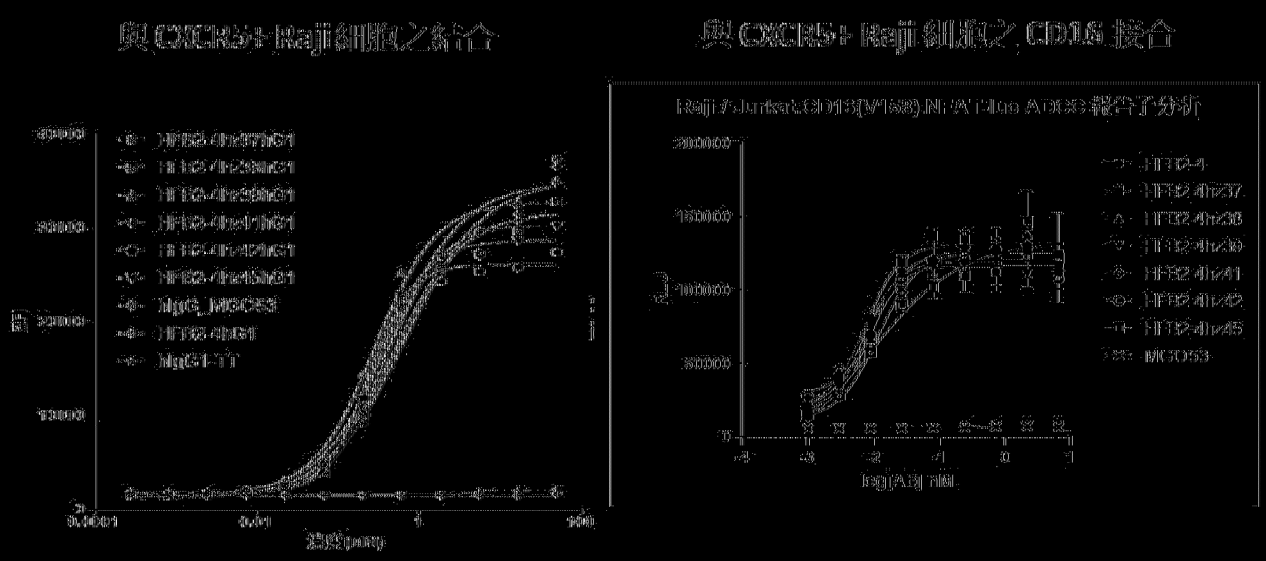
Ab濃度為1nM及0.1nM

[圖 19B]

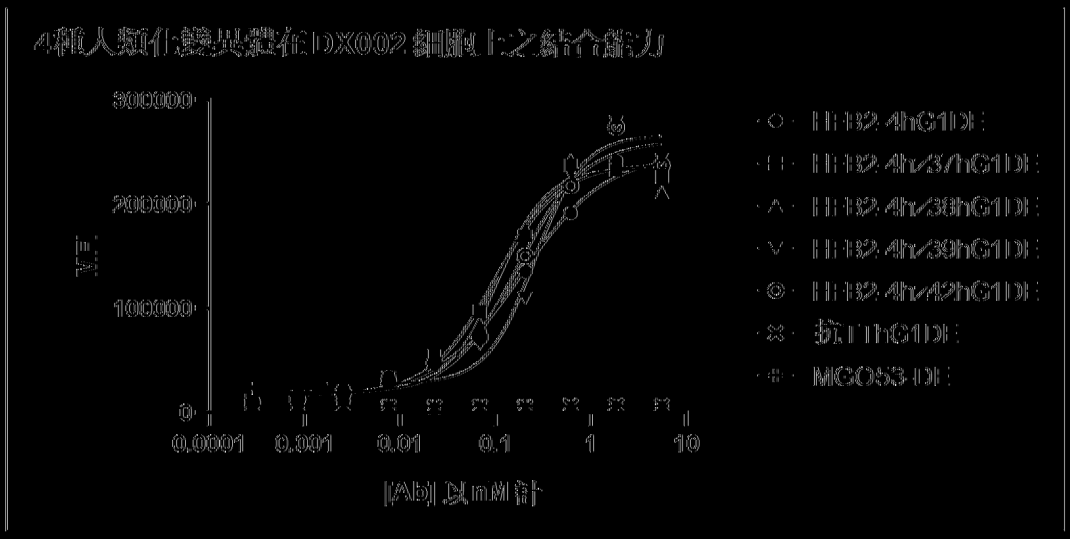

0h
1h
24h
36h
投與HFB1002
各測試項目
對於各個測試時間點之Snapshot PK研究
HFB2-4-hG1(陽性對照)
10mg/kg
IV給藥
(靜脈內注射)
收集不凝固血>50μl
收集至少200μl血液樣品
→進行ELISA濃度(ng/ml)測試


HFB1002 snapshot PK
1000
100
10
0
50
100
最後採之小時數
HFB2-4-hG1
HFB2-VH4VL5
HFB2-VH5VL7
HFB2-VH5VL7
HFB2-VH4VL7
HFB2-VH5VL5
HFB2-VH3VL5
HFB2-VH3VL7
HFB2-VH5VL7
HFB2-VH10VL7
HFB2-VH5VL6

[圖 20]

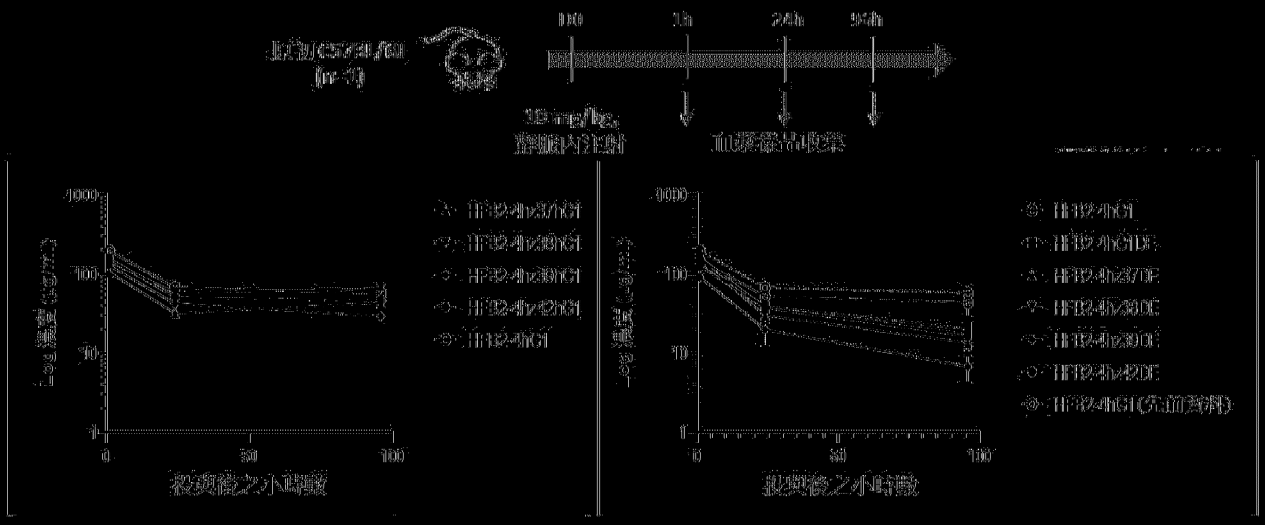

與CXCR5+ Raji細胞之結合
與CXCR5+ Raji細胞及CD16結合
Raji/Jurkat(CD16)(V158) NFAT Blue Assay報告子分析
MFI
Antibody
Log[Ab] nM

[圖 21]

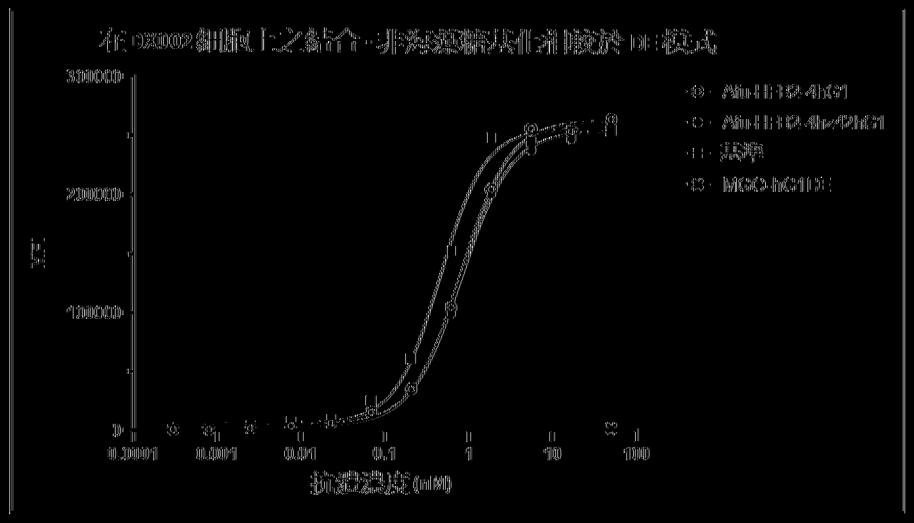


	H1L2-4hG1D	H1L2-4h/37hG1D	H1L2-4h/38hG1D	H1L2-4h/39hG1D	H1L2-4h/42hG1D
EC50 (nM)	0,1172	0,0785	0,08781	0,2324	0,1231
R2	0,9013	0,9428	0,9184	0,9449	0,9145

[圖 22,]


正常C57BL/6J
(n=4)
0h
1h
24h
96h
15 mg/kg,
静脈内注射
10匹/群/時点
1000
100
10
1
0
50
100
投与後の時間
血漿中濃度 (μg/mL)
HB2-mG1
HB2-mG1(Fab'2)
HB2-mG1(Fab')
HB2-mG1(Fab)
HB2-mG1(Fab'2)-PEG
HB2-mG1(Fab')-PEG
HB2-mG1(Fab)-PEG
HB2-mG1(Fab'2)-mPEG
HB2-mG1(Fab')-mPEG
HB2-mG1(Fab)-mPEG
HB2-mG1(Fab'2)-mPEG(Fab'2)
投与後の時間
血漿中濃度 (μg/mL)

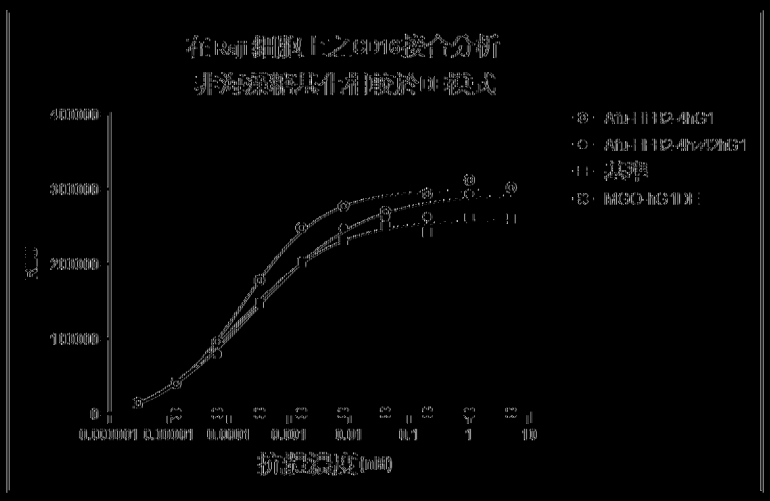
[図 23]



	Afu-HBB2.4hG1	基準	Afu-HBB2.4hv42hG1
EC50 (nM)	0.81	0.46	0.82

*基準: afu-hBMKhG1

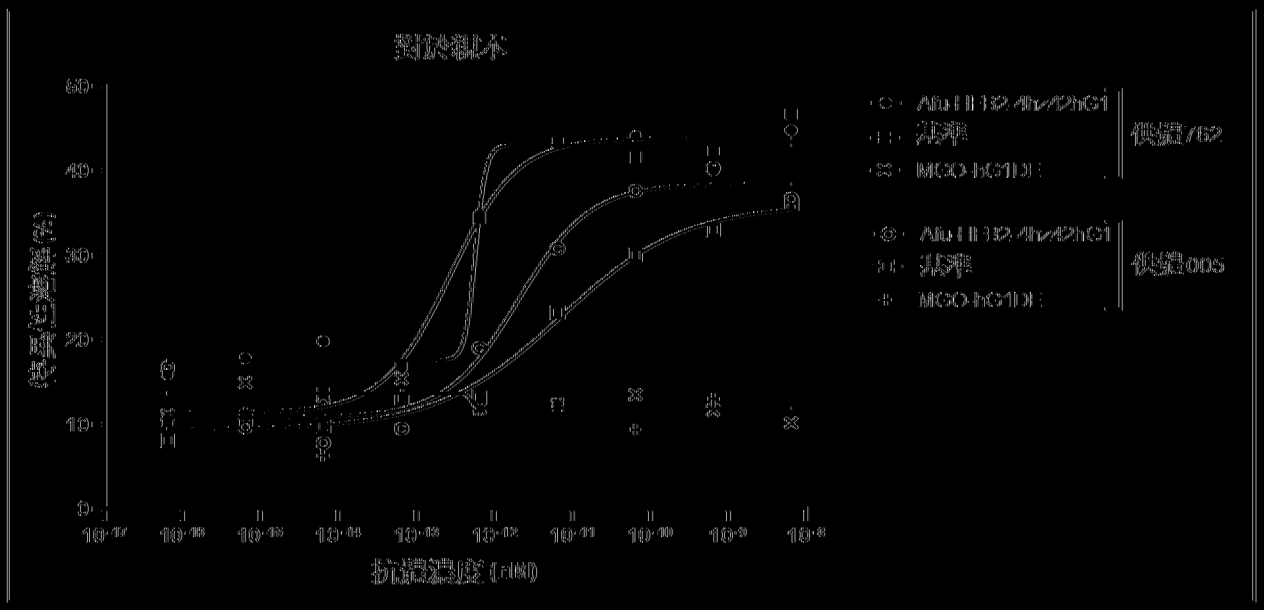
[(圖 24A)]



EC50 nM	Afu-hBMKhG1 1.7E-04	基準 1.4E-04	Afu-hBMKhv42bG1 2.6E-04

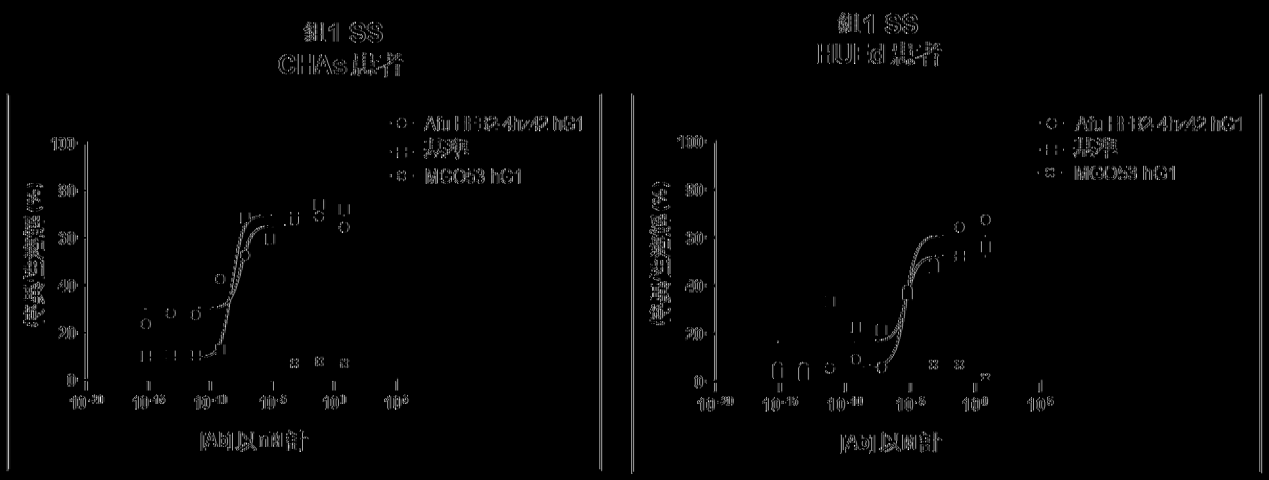
* 基準：afu-hBMKhG1

(図 24B)



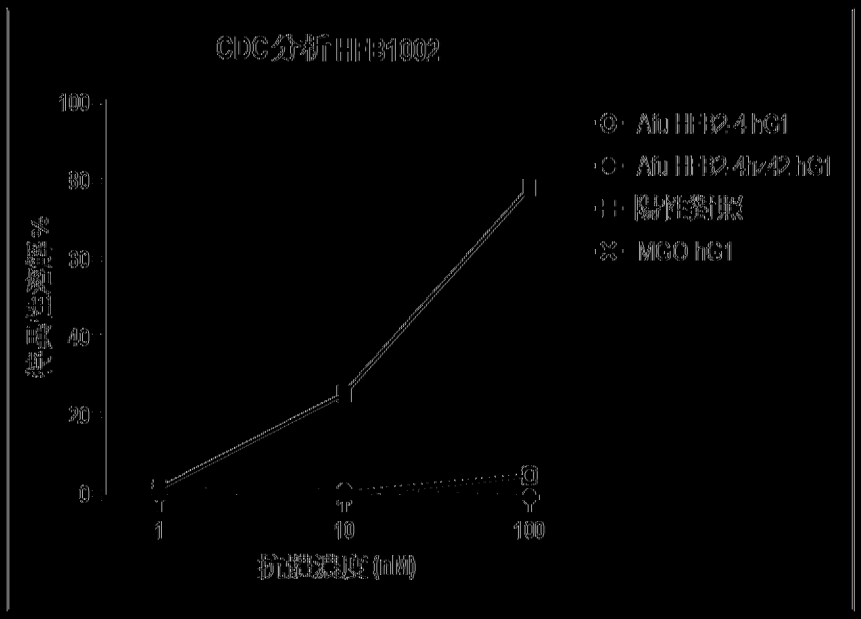
EC50 (nM)	供體762	Afu1IIG12.4bv02hG1 ~ 5.796e-013	基準 2.7E-13
	供體005	2.0E-12	7.2E-12

[圖 25]

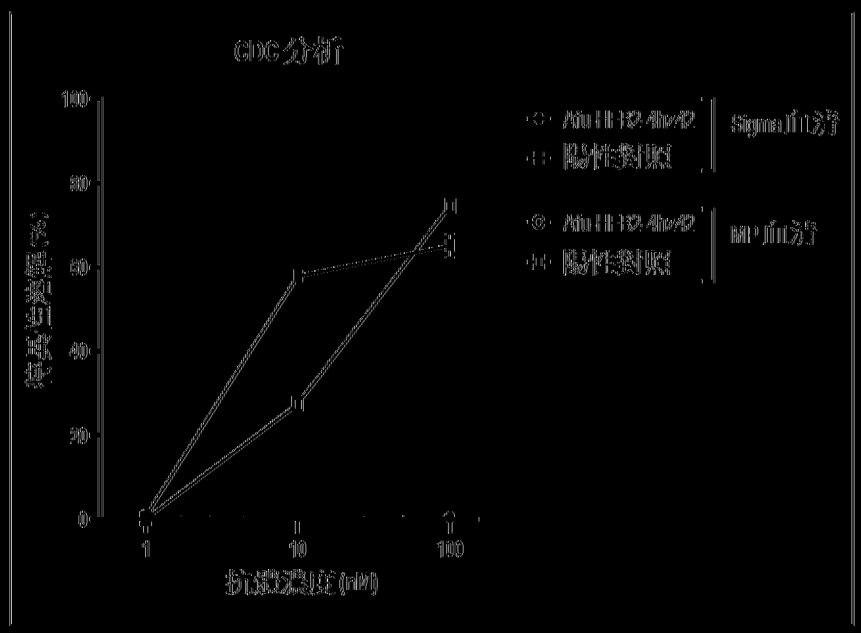


	B細胞株此品	Afu-HH2-4hp42	此件
EC50 (nM)	CHAs	3.1e-017	5.6e-018
	HUrd	4.7e-015	5.3e-015

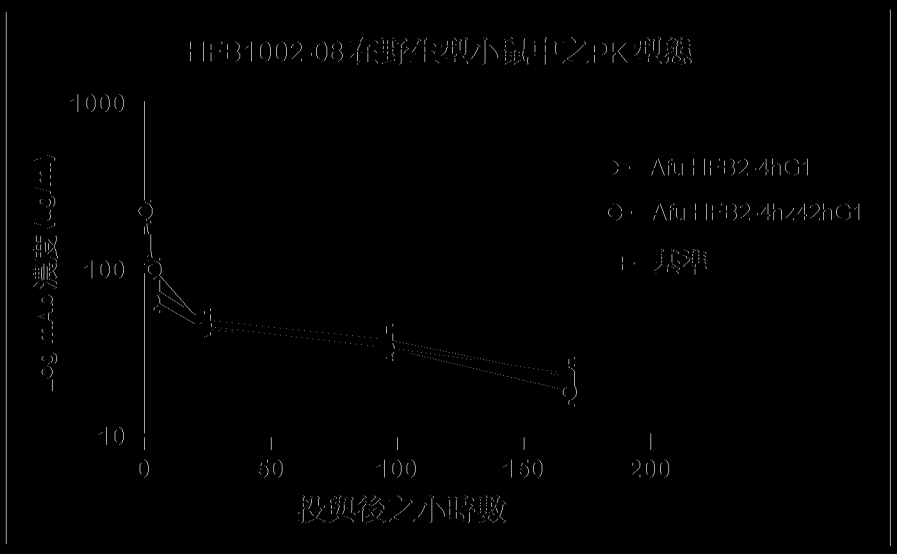
|(圖 26)|


CDC分析 HER2002
100
80
60
40
20
0
1
10
100
抗体濃度 (nM)
Atu HER2-4 hG1
Atu HER2-4v-42 hG1
陽性対照
MGO hG1

[図 2/A]


CDC分析
100
80
60
40
20
0
1
10
100
抗体濃度 (nM)
Atu HER2-4v-42
陽性対照
Sigma血清
Atu HER2-4v-42
陽性対照
MP血清

[図 2/B]

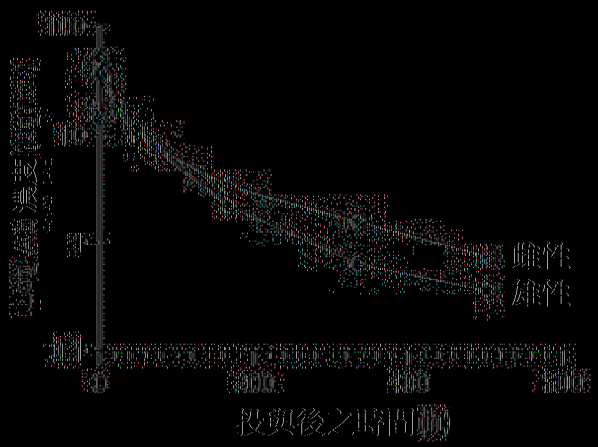


	Afu-HFB2-4hG1	Afu-HFB2-4hz42	基準
T1/2 (h)	165	114	139

*基準：afu-hBMKhG1

[圖 28A]

在食蟹猴中之PK型態



參數	單位	評估	
		雌性	雄性

[圖 28B]

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗人類CXCR5抗體及其用途

【英文發明名稱】ANTI-HUMAN CXCR5 ANTIBODY AND USES THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 C-X-C趨化因子受體類型5 (CXC-R5) (亦稱為CD185 (分化簇185))或伯基特氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma)受體1 (*BLR1*)為趨化因子CXCL13 (亦稱為BLC)之G蛋白偶合七跨膜受體且屬于CXC趨化因子受體家族。在人類中，CXC-R5蛋白由*CXCR5*基因編碼，且其使T細胞能夠遷移至淋巴結B細胞區。

【0002】 *BLR1*/*CXCR5*基因特定而言在伯基特氏淋巴瘤及淋巴組織(諸如淋巴結中以及脾臟中之濾泡)中表現。該基因在B細胞遷移中發揮必要作用。通過CXCL13分泌，B細胞能夠定位淋巴結。另外，一些當前研究表明CXCL13通過CXCR5能夠招募造血前驅細胞($CD3^-CD4^+$)，此將引起淋巴結及派爾斑(Peyer's Patch)之發育。

【0003】 另一方面，T細胞在沒有CXCR5表現之情況下不能到達B細胞濾泡。此為高親和力抗體製備中之关键步驟，因為B細胞及T細胞需要相互作用以活化Ig類別轉換。

【0004】 因此，已顯示CXCR5將在成熟休眠B細胞、扁桃體B細胞、CD4與CD8 T細胞上表現，不過常常将其视為確定T濾泡輔助(Tfh)細胞之標記物。

【0005】 乳癌患者中之CXCR5過表現與淋巴結轉移高度相關。此外，升高之CXCR5表現可促進缺乏功能性p53蛋白之乳房腫瘤中之異常細胞存活及遷移。SNP rs630923之微小等位基因定位於CXCR5基因啟動子區且與多發性硬化之風險相關，使得出現在活化期間引起B細胞中之CXCR5基因啟動子活性降低之MEF2C結合位點，從而可導致自身免疫反應降低。

【0006】 CXCR5還與前列腺癌之轉移性進展有關，已發現前列腺癌組織以及細胞株表現較高非基礎水準之CXCR5。此外，發現了CXCR5表現水準與格裡森得分(Gleason score)之間的相關性。

【0007】 CXCR5為GC (生髮中心，Forster等人, 1996 -Allen等人2004)之極化/組織所需的。CXCR5及其配位體CXCL13為B/T邊界區之B/T細胞遷移至二級淋巴器官之GC中所需的(Allen等人, 2004-Relf等人, 2012)。B/T區中之B/T細胞相互作用為BCR親和力成熟及B細胞擴增所需的(Breitfield等人, 2000)。

【0008】 大多數趨化因子已知結合至超過一種受體。然而，CXCR5-CXCL13相互作用似乎為獨特的，因為沒有其他配位體結合CXCR5且沒有其他受體結合CXCL13，雖然CXCR3為與CXCR5具有約38.5%胺基酸序列一致性或51.5%相似性之最靠近的旁系同源物。

【0009】 休格蘭症候群(Sjögren syndrome) (SjS、SS)為一種長期自體免疫疾病，其影響身體之水分產生腺體。該疾病以在1933年對其進行描述之Henrik Sjögren命名。SS之主要症狀包括口乾及眼乾。其他症狀可包括皮膚乾燥、陰道乾燥、慢性咳嗽、手臂及腿部麻木、疲勞感、肌肉及關節疼痛及甲狀腺問題。彼等受影響之患者之淋巴瘤風險亦增加(5%)。

【0010】 0.2%-1.2%之人口受到SS之影響，其中一半具有原發形式(其獨立於其他健康問題發生)且一半具有繼發形式(其為另一結締組織病症之結果)。女性受到影響為男性的約十倍，且其通常在中年開始；但任何人均可受影響。在彼等沒有其他自體免疫病症之患者中，預期壽命不變。

【0011】 雖然SS之確切原因尚不清楚，但咸信涉及遺傳學與環境誘因(諸如暴露於病毒或細菌)之組合。產生之炎症逐漸損害腺體。

【0012】 當前對SS之治療係針對症狀。乾眼症治療包括人工眼淚、藥物減輕炎症、封閉淚點或手術關閉淚腺。對於口乾，可使用口香糖(較佳不含糖)、啜

飲清水或唾液取代物。在具有關節或肌肉疼痛的彼等患者中，可使用布洛芬(ibuprofen)。還可停止使用可引起乾燥之藥物，諸如抗組織胺。

【0013】 因此，需要開發治療休格蘭症候群以及其他機械相關疾病或適應症之治療性試劑。

【發明內容】

【0014】 本文所描述之發明提供拮抗性抗hCXCR5抗體，其亦通過抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)選擇性地消耗CXCR5$^+$細胞，此不僅抑制Tfh與B細胞之遷移，而且消除已存在之CXCR5$^+$細胞，因此減少組織損傷及致病性抗體產生。

【0015】 因此，本文所描述之發明提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5 (hCXCR5)具特異性，且其中該單株抗體包含：(1)重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列；其中該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；視情況，該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一單株抗體之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；及/或(2)輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列；其中該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列；視情況，該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一單株抗體之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0016】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 1、2及3之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列

及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 9、10及11之胺基酸序列。

【0017】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 17、18及19之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 25、26及27之胺基酸序列。

【0018】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、34及35之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 41、42及43之胺基酸序列。

【0019】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列。

【0020】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及65之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列。

【0021】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 69、70及71之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 76、77及78之胺基酸序列。

【0022】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 149、150及151之胺基酸序列。

【0023】 在一些實施例中，VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 114、115及116之胺基酸序列，且VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 120、121及122之胺基酸序列。

【0024】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段為小鼠-人類嵌合抗體，該小鼠-人類嵌合抗體包含人類抗體(諸如hIgG1、hIgG2、

hIgG3或hIgG4)之恆定區序列，其中VH序列為SEQ ID NO: 8、24、40、56、165或75中之任一者或與SEQ ID NO: 8、24、40、56、165或75之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，及/或其中VL序列為SEQ ID NO: 16、32、48、63、68或83中之任一者或與SEQ ID NO: 16、32、48、63、68或83之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0025】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 8或與SEQ ID NO: 8具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 16或與SEQ ID NO: 16具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0026】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 24或與SEQ ID NO: 24具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 32或與SEQ ID NO: 32具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0027】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 40或與SEQ ID NO: 40具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 48或與SEQ ID NO: 48具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0028】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 56或與SEQ ID NO: 56具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 63或與SEQ ID NO: 63具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0029】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 165或與SEQ ID NO: 165具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致

性，且VL序列為SEQ ID NO: 68或與SEQ ID NO: 68具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0030】 在一些實施例中，VH序列為SEQ ID NO: 75或與SEQ ID NO: 75具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且VL序列為SEQ ID NO: 83或與SEQ ID NO: 83具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【0031】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段為人類化抗體，視情況，其中該人類化抗體包含：(1)表B、表D及表E中之任一單株抗體之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列；及/或表C、表D及表E中之任一單株抗體之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(2) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(3) SEQ ID NO: 113之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(4) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 101之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；(5) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 109之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列。

【0032】 在一些實施例中，人類化抗體包含：表B及表D中之任一抗體之VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4。

【0033】 在一些實施例中，VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4序列分別包含(i)與SEQ ID NO: 84、85、86及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(ii)與SEQ ID NO: 89、90、91及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iii)與SEQ ID NO: 93、94、95及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iv)與SEQ ID NO: 132、85、110及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(v)與SEQ ID NO: 93、126、127及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vi)與SEQ ID NO: 132、133、134及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vii)與SEQ ID NO: 138、94、139及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(viii)與SEQ ID NO: 141、142、143及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0034】 在一些實施例中，人類化抗體包含：表C及表D中之任一抗體之VL構架區序列VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4。

【0035】 在一些實施例中，VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4序列分別包含(i)與SEQ ID NO: 97、98、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、

90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(ii)與SEQ ID NO: 97、102、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iii)與SEQ ID NO: 103、104、105及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(iv)與SEQ ID NO: 103、107、108及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(v)與SEQ ID NO: 50、135、136及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vi)與SEQ ID NO: 128、129、130及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(vii)與SEQ ID NO: 145、146、147及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；(viii)與SEQ ID NO: 97、98、152及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或(ix)與SEQ ID NO: 154、102、99及47之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0036】 在一些實施例中，VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4序列分別包含(i) SEQ ID NO: 93、94、95及87，(ii) SEQ ID NO: 132、85、110及87，(iii) SEQ ID NO: 93、126、127及87，或(iv) SEQ ID NO: 132、133、134及87；及/或VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4序列分別包含(i) SEQ ID NO: 50、135、136及131，或(ii) SEQ ID NO: 128、129、130及131。

【0037】 在一些實施例中，VH序列包含SEQ ID NO: 96之胺基酸序列且VL序

列包含SEQ ID NO: 112之胺基酸序列，或VH序列包含SEQ ID NO: 113之胺基酸序列且VL序列包含SEQ ID NO: 112之胺基酸序列。

【0038】 在一些實施例中，VH序列包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列且VL序列包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列。

【0039】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有SEQ ID NO: 114-116之VH CDR1-CDR3胺基酸序列的VH序列，及含有SEQ ID NO: 120-122之VL CDR1-CDR3胺基酸序列的VL序列。

【0040】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有SEQ ID NO: 113之胺基酸序列的VH序列及含有SEQ ID NO: 112之胺基酸序列的VL序列。

【0041】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有HFB2-4hz42hG1之VH序列之VH CDR1-CDR3胺基酸序列的VH序列及含有HFB2-4hz42hG1之VL序列之VL CDR1-CDR3胺基酸序列的VL序列。

【0042】 在某些實施例中，分離之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的(例如Fc N-聚醣上不存在核心海藻糖，因此顯示增加IgG1 Fc對FcγRIIIa之結合親和力)，且包含含有HFB2-4hz42hG1之VH序列之胺基酸序列的VH序列及含有HFB2-4hz42hG1之VL序列之胺基酸序列的VL序列。

【0043】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段包含經修飾之Fc區以增強ADCC。

【0044】 在某些實施例中，經修飾之Fc區包含：(1)

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L突變以增強FcγRIIIa結合；(2) S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合；(3) S239D/I332E/A330L突變以同時增強FcγRIIIa結合且降低FcγRIIIb結合；(4) S298A/E333A/K334A突變以增強FcγRIIIa結合；及/或(5) Fc區之非海藻糖基化N297以增強FcγRIIIa結合。

【0045】 在某些實施例中，其抗原結合片段為Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【0046】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段的ADCC活性具有低(例如1-5或1-2) pM範圍EC50值。

【0047】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段針對表現表面hCXCR5之原代B細胞及/或表現表面hCXCR5之原代T細胞具有ADCC活性。

【0048】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【0049】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段抑制cAMP信號傳導(例如EC50小於1 nM)。

【0050】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段抑制趨化性(例如在約0.1-0.5 nM或約0.1 nM下具有約100%抑制)。

【0051】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段抑制hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【0052】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段實質上不與hCXCR3交叉反應。

【0053】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段結合

至黏附細胞株(諸如DX002)及/或懸浮細胞株(諸如M300-19)上所表現之hCXCR5。

【0054】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段不與或最低限度地與hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物交叉反應。

【0055】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段降低個體中記憶B細胞群體之百分比。

【0056】 在某些實施例中，本發明之分離之單株抗體或其抗原結合片段以小於約25 nM、20 nM、15 nM、10 nM、5 nM、2 nM或1 nM或更小之K_d結合hCXCR5。

【0057】 本發明之另一態樣提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其與任一前述實施例之分離之單株抗體或其抗原結合片段競爭結合至相同抗原決定基。

【0058】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之休格蘭症候群(SS)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0059】 在某些實施例中，該方法緩解SS之至少一種症狀。

【0060】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之淋巴瘤或白血病的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0061】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為B細胞淋巴瘤。

【0062】 在某些實施例中，B細胞淋巴瘤為CLL (B細胞慢性淋巴細胞性白血病)。

【0063】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)，諸如伯基特氏淋巴瘤。

【0064】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之具有異位生髮中心之疾病或適應症(包括自體免疫疾病或病症)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0065】 在某些實施例中，疾病或適應症為類風濕性關節炎(RA)、系統性紅斑狼瘡(SLE)、乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、I型糖尿病、多發性硬化(MS)、類肉瘤病、銀屑病、重症肌無力、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyrioiditis)、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、動脈硬化、結膜炎、胃炎、肝炎或皮炎。

【0066】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之實體癌症的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)，其中實體癌症視情況為胃癌、乳癌、腸癌、肺癌或前列腺癌。

【0067】 在某些實施例中，治療淋巴瘤或白血病之方法及/或治療實體癌症之方法進一步包括向患者投與化學治療劑、抗血管生成劑、生長抑制劑、免疫腫瘤劑及/或抗贅生組合物。

【0068】 本發明之另一態樣提供編碼本發明之重鏈或輕鏈或其抗原結合部分之聚核苷酸。

【0069】 在某些實施例中，聚核苷酸經密碼子優化以在人類細胞中表現。

【0070】 本發明之另一態樣提供一種包含本發明之聚核苷酸的載體。

【0071】 在某些實施例中，載體為表現載體(例如哺乳動物表現載體、酵母表現載體、昆蟲表現載體或細菌表現載體)。

【0072】 應瞭解，除非明確否認或除非不適當，否則本發明之任一實施例(包括僅在實例或申請專利範圍中描述之實施例)可與本發明之任何一或多個其他實施例組合。

【圖式簡單說明】

【0073】

圖1顯示人類CXCR5與其最靠近之旁系同源物CXCR3之序列比對，其具有低38.5%序列一致性及51.5%序列相似性。依出現順序，圖1分別揭示SEQ ID NO: 167-168。

圖2A及2B顯示各種經鑑定之小鼠抗CXCR5單株抗體之VH (圖2A)及VL (圖2B)區的IMGT序列比對。將VH及VL序列之CDR1-CDR3突出顯示。所有抗體獲自不同VDJ重組事件(不同家族)。雖然HFB2-3與VH4及VH5具有類似VH序列，但CDR3更不同，因此賦予獨特特性。HFB2-4及HFB2-5在CDR3區序列中之不同之處為1個胺基酸(a.a)。依出現順序，圖2A及2B分別揭示SEQ ID NO: 169-180。

圖3顯示野生型小鼠中嵌合抗CXCR5小鼠單株抗體HFB2-4hG1之藥物動力學(PK)型態。

圖4A及4B分別顯示基於小鼠單株抗體HFB2-4之3個人類化VH區及4個人類化VL區之IMGT序列比對。依出現順序，圖4A及4B分別揭示SEQ ID NO: 172、181-183、178及184-187。

圖5顯示本發明之若干嵌合單株抗體對黏附細胞株上所表現之hCXCR5抗原之亞nM EC50結合能力。

圖6A表明基於抗體交叉反應性評估，本發明之嵌合抗體與瞬時轉染細胞上所表現之食蟹猴及鼠CXCR5基本上沒有交叉反應性。

圖6B表明本發明之嵌合抗體不結合至hCXCR5-hCXCR3之最靠近之異種同源物。

圖7表明本發明之抗CXCR5抗體高效抑制配位體(CXCL13)誘導之B細胞遷移。

圖8顯示某些抗CXCR5單株抗體對細胞內cAMP信號傳導之效應。資料表明嵌合抗體中之兩者在配位體(CXCL13)活化後高效阻斷cAMP信號傳導。

圖9A顯示對本發明之六種嵌合單株抗體之ADCC報告子生物分析之結果。資料表明本發明抗CXCR5單株抗體可通過接合CD16觸發ADCC，其中HFB2-4展示最有效之CD16接合。

圖9B顯示使用HFB2-4hG1及HFB2-4hG1DE抗體之ADCC報告子生物分析。分析中亦包括抗CD20 IgG1 (陽性對照)及同型匹配之陰性對照IgG1抗體。圖下之表格中提供代表性EC50值(不一定與圖中之值匹配)。

圖9C顯示與陽性對照利妥昔單抗(Rituximab)及同型對照(MGO53-hG1DE)相比HFB2-4hG1DE介導之原代NK細胞對Raji細胞之ADCC溶解。

圖9D顯示與陽性對照利妥昔單抗及同型對照(MGO53-hG1DE)相比HFB2-4hG1DE介導之原代NK細胞對原代B細胞之ADCC溶解。

圖9E顯示與同型對照(MGO53-hG1DE)及沒有抗體($CD4^+$細胞+ NK)相比由HFB2-4hG1DE誘導之原代NK細胞對原代T細胞之ADCC介導之溶解。亦參見圖9F。

圖9F顯示在5:1之E:T比率下與利妥昔單抗(hG1)、同型對照(MGO53-hG1)及沒有抗體($CD4^+$細胞+ NK)相比由非海藻糖基化抗體AfuHFB2-4hG1誘導之原代NK細胞對原代T細胞之ADCC介導之溶解。利妥昔單抗靶向所有B細胞之表面所表現之CD20，且因此利妥昔單抗預期不靶向不表現CD20之T細胞。

圖9G及9H顯示在3:1之E:T比率下使用HFB2-4hG1DE、呈hG1模式之利妥昔單抗(陽性對照)及DE同型對照使用來自原發性休格蘭症候群(SS)患者(圖9G)及淋巴增生性pSS患者(圖9H)之B細胞作為靶細胞之ADCC報告子分析之結果。頂部圖：ADCC報告子分析之發光讀數(RLU)。底部圖：誘導倍數，計算為RLU (具有抗體-背景)/RLU (單獨細胞-背景)。在底部圖中，左側柱：HFB2-4hG1DE，中間柱：陽性對照，右側柱：同型對照。

圖10A及10B顯示藉由兩種不同方案進行之抗體內化的量測。結果表明與陽性對照(CD71)抗體相比，HFB2-4hz9-hG1DE與HFB2-4hz12-hG1DE (兩者均為基於HFB2-4嵌合抗體之人類化抗體)均不內化。

圖11A及11B顯示使用所選人類化變異體抗體之ADCC報告子生物分析之結果。

圖12顯示由所選人類化變異體引起之趨化性抑制。

圖13顯示使用原代B細胞之ADCC報告子生物分析。

圖14顯示靶向結合至不同癌細胞株。

圖15顯示對B細胞淋巴瘤細胞株之ADCC報告子分析。

圖16顯示HFB2-4-hG1之抗腫瘤活體內功效研究之結果。與對照(PBS或同型匹配之MGO53-hG1抗體)相比，HFB2-4hG1與陽性對照均為統計顯著性的(p<0.00001****)。

圖17顯示本發明抗體對休格蘭患者之B細胞之ADCC活性。

圖18顯示pSS患者之樣品中記憶B細胞群體之百分比因本發明抗體而降低。

圖19A及19B顯示HFB2-4hG1之其他人類化變異體(HFB2-4hz-hG1)與Raji細胞之結合。箭頭指示具有最名靠前的結合型態之人類化變異體。

圖20顯示排名最靠前的九種人類化HFB2-4hz-hG1變異體之藥物動力學型態。

圖21顯示排名最靠前的6種HFB2-4hz-hG1變異體與CXCR5+ Raji細胞之結合(左側圖)及報告子系統中用於接合CD16之ADCC活性。

圖22顯示呈hG1DE模式之HFB2-4hz變異體與表現CXCR5之黏附DX002細胞之結合。

圖23顯示呈親本hG1模式(左側圖)及hG1DE模式(右側圖)之排名最靠前的四種人類化HFB2-4hz之藥物動力學型態。

圖24A顯示非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)、非海藻糖基化親本HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)、非海藻糖基化基準hG1抗體及同型對照(MGO53-hG1)與表現CXCR5之DX002細胞之結合。

圖24B顯示afu-HFB2-4hz42-hG1、afu-HFB2-4hG1、非海藻糖基化基準hG1抗體及同型對照(MGO53-hG1)之藉由ADCC報告子分析確定之CD16接合。

圖25顯示與基準及同型對照(MGO53-hG1)抗體相比，由非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)介導之原代NK細胞對來自健康供體之原代B細

胞之ADCC介導之溶解。

圖26顯示與基準及同型對照(MGO53-hG1)抗體相比，由非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)介導之原代NK細胞對來自SS患者之B細胞之ADCC介導之溶解。

圖27A及27B顯示非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)、非海藻糖基化親本HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)、呈hG1模式之利妥昔單抗(陽性對照)及同型對照MGO53-hG1之針對補體依賴性細胞毒性(CDC)活性之測試的結果。使用血清來提供補體系統。在圖27B中，測試兩種不同血清。

圖28A顯示野生型小鼠中非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)、非海藻糖基化親本HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)及基準抗體之藥物動力學型態(n=1)。

圖28B顯示1雄性及2雌性食蟹猴中非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)之藥物動力學型態。

【實施方式】

相關申請案之參考

【0074】 本申請案主張於2021年3月9日申請之美國臨時專利申請案第63/158,462號及於2021年8月5日申請之國際專利申請案第PCT/CN2021/111049號之優先權，以上參考申請案中之每一者的全部內容，包括任何圖式及序列表，以引用之方式併入本文中。

1. 綜述

【0075】 根據本文所描述之發明，使用多種免疫策略將小鼠用重組人類CXCR5免疫。與申請人所有之基於單細胞之抗體篩選技術組合，自三次獨立篩選鑑定了六種高親和力抗CXCR5小鼠單株抗體HFB2-1至HBF2-6。

【0076】 針對所需功能特徵對此等抗體進行進一步測試，包括特異性(例如

與hCXCR3幾乎沒有交叉反應性)、對細胞株(例如黏附細胞株，諸如DX002；及懸浮細胞株，諸如M300-19)上所表現之CXCR5之結合親和力、交叉反應性(例如hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物)、對B細胞遷移(趨化性)之影響、對細胞內cAMP水準之影響、ADCC報告子分析、使用表現CXCR5之穩定細胞株的內化分析及在小鼠中之PK型態等。

【0077】 舉例而言，FACS (流式細胞術)分析表明除一種外全部先導候選抗體針對表現hCXCR5之CHO細胞顯示亞nM EC50值，且先導抗體(lead antibody)中無一者與食蟹猴或小鼠CXCR5異種同源物交叉反應。此外，先導抗體中無一者結合至hCXCR3旁系同源物，證實其特異性。先導抗體亦高效阻斷hCXCL13誘導之B細胞遷移，且HFB2-4嵌合抗體抑制趨化性為最高效的。HFB2-4及HFB2-5高效阻斷hCXCL13誘導之cAMP信號傳導，且優於基準抗體。ADCC報告子分析(Promega)表明抗hCXCR5 mAb (尤其HFB2-4)接合CD16。

【0078】 基於此等測試，在6種單位數蓁莫耳親和力抗體中，選擇HFB2-4作為在功能分析中具有最高效能及最大效應者，且針對其在野生型小鼠中之PK型態進一步分析。結果表明HFB2-4在小鼠中展現有利PK型態。

【0079】 在腫瘤之小鼠Raji模型中測試HFB2-4之抗腫瘤功效之初步結果亦顯示等同於作為陽性對照之利妥昔單抗的有前景之抗腫瘤效應。

【0080】 基於HFB2-4之總優良生物型態，將其選為用於進一步測試且用於人類化之先導抗體。

【0081】 已藉由將3個VH及4個VL區CDR序列組合(VH1與VL1-VL4中之每一者，VH2與VL1-VL4中之每一者，且VH3與VL1-VL4中之每一者)產生了至少12種人類化變異體(全部具有S239D/I332E突變)，且進行表徵；且進一步合成了另外13種變異體。值得注意的是，根據IMGT系統，所有人類化(Hz)變異體均具有人類生殖系序列之第一匹配。此等人類化變異體大部分保留其物理化學活性(對

靶標之親和力、穩定性、溶解度等)及/或生物活性(阻斷或刺激靶標、ADCC等)。

【0082】 針對所需功能特徵對此等人類化變異體抗體進行進一步測試，包括特異性(例如與hCXCR3幾乎沒有交叉反應性)、對細胞株(例如黏附細胞株，諸如DX002；及懸浮細胞株，諸如M300-19)上所表現之CXCR5之結合親和力、交叉反應性(例如hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物)、對B細胞遷移(趨化性)之影響、對細胞內cAMP水準之影響、使用表現CXCR5之穩定細胞株之內化分析、抗體可開發性評估(諸如SEC及SDS-PAGE分析)、ADCC報告子分析及在小鼠中之PK型態等。

【0083】 結果表明12種HFB2-4hz變異體中10種顯示與親本抗體HFB2-4類似之與hCXCR5之結合；12種HFB2-4hz變異體中9種阻斷cAMP信號傳導；Hz變異體有效抑制趨化性，其中HFB2-4hz12為最有效的(在0.1 nM下約100%)，且HFB2-4hz9中效應類似；且有效阻斷hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【0084】 基於HFB2-4hz12之總優良生物型態，將其選為用於ADCC測試之先導候選物。結果表明HFB2-4hz12hG1DE以及HFB2-4hz9hG1DE具有達至低pM範圍(1-2 pM) EC50之有效ADCC活性。資料進一步表明人類化過程不改變候選抗體(例如HFB2-4DE抗體)之高ADCC效能。另外，HFB2-4hz12hG1DE對表現hCXCR5之原代B細胞顯示ADCC活性。

【0085】 內化研究表明HFB2-4hz12-hG1DE及HFB2-4hz9-hG1DE Hz變異體不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【0086】 PK型態表明與親本抗體HFB2-4hG1 (109 h)相比，HFB2-4hz12-hG1DE在血漿中具有更短之半衰期(4.5h)。

【0087】 亦針對許多可開發性分析對包括HFB2-4hz2hG1、HFB2-4hz9hG1DE、HFB2-4hz10hG1DE、HFB2-4hz11hG1DE及HFB2-4hz12hG1DE之

所選Hz抗體進行測試，該等可開發性分析包括在25及40℃下持續長達14天之加速穩定性研究；在25℃下在100 mM乙酸鹽(pH 3.5)中長達6小時之強制降解研究；及在PBS (pH 7.4)中多至三個冷凍/解凍循環(全部為2 mg/mL抗體濃度)。結果表明根據SDS-PAGE凝膠，HFB2-4hz12hG1DE具有最穩定之型態。總體來說，HFB2-4hz9hG1DE及HFB2-4hz12hG1DE在所測試抗體中顯示最有利之型態，且選擇用於產生基於該等抗體之其他Hz變異體。

【0088】 產生且選擇許多其他第二輪人類化抗體。此類第二輪人類化(Hz)變異體列於下表中。所測試之所有此類人類化變異體均以亞nM EC50值結合hCXCR5。所有此類Hz變異體均以亞nM EC50結合hCXCR5。在親本抗體及人類化變異體抗體中發現類似之結合特性，包括對hCXCR5之結合親和力，及接合CD16以誘導ADCC。

表1. 所選第二輪人類化變異體

Ab變異體	V-基因名稱 (VH)	人類化% (VH)	V-基因名稱(VL)	人類化%(VL)	實驗1 EC50 (nM)	實驗2 EC50 (nM)
HFB2-4hG1DE	嵌合親本				1	1.3
HFB2-4hz9-hG1DE	VH3	87.4	VL1	91.4	1.3	1
HFB2-4hz14-hG1DE	VH3	87.4	VL1b	96.8	0.4	0.1
HFB2-4hz15-hG1DE	VH3	87.4	VL1c	88.2	0.6	0.05
HFB2-4hz18-hG1DE	VH3c	83.2	VL1	91.4	0.6	0.1
HFB2-4hz19-hG1DE	VH3d	86.3	VL1	91.4	0.5	0.2
HFB2-4hz12-hG1DE	VH3	87.4	VL4	83.9	1.2	0.3
HFB2-4hz24-hG1DE	VH3	87.4	VL4c	79.6	0.5	0.2
HFB2-4hz27-hG1DE	VH3c	83.2	VL4	83.9	0.3	0.8
HFB2-4hz28-hG1DE	VH3d	86.3	VL4	83.9	0.7	1.8
HFB2-4hz31-hG1DE	VH3c	83.2	VL1b	96.8	0.4	0.4
HFB2-4hz32-hG1DE	VH3c	83.2	VL1c	88.2	0.5	0.5
HFB2-4hz33-hG1DE	VH3d	86.3	VL1b	96.8	0.3	0.3
HFB2-4hz34-hG1DE	VH3d	86.3	VL1c	88.2	0.6	0.5
HFB2-4hz35-hG1DE	VH3c	83.2	VL4c	79.6	0.7	0.6
HFB2-4hz36-hG1DE	VH3d	86.3	VL4c	79.6	0.5	0.4

【0089】 在此等二級Hz變異體中，選擇HFB2-4hz14-hG1DE及HFB2-4hz15-hG1DE用於進一步可開發性評估(參見上文所描述之分析)。結果表明當在20 mM乙酸鹽(pH 6.0)中調配時，Hz14及Hz15 DE變異體在25及40°C下未顯示不穩定性。此外，在冷凍/解凍循環及低pH值應力處理(pH3.5達6小時)之後穩定性通常保留。總體來說，HFB2-4之人類化變異體(包括HFB2-4hz9-hG1DE、HFB2-4hz12-hG1DE、HFB2-4hz14-hG1DE及HFB2-4hz15-hG1DE)全部展現有利之可開發性型態。選擇此等先導候選物中之一者(HFB2-4hz12-hG1DE)用於進一步開發。

【0090】 基於HFB2-4hG1 (HFB2-4hz-hG1)產生其他基於HFB2-4之人類化變異體，包括HFB2-4hz37-hG1及HFB2-4hz42-hG1。參見實例5及尤其表4。

【0091】 因此，本文所描述之發明提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5 (hCXCR5)具特異性，且其中該單株抗體包含：(1)重鏈可變區(HCVR)，該重鏈可變區包含分別為圖2A之單株抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之任一HCVR CDR1、CDR2及CDR3序列之HCVR CDR1序列、HCVR CDR2序列及HCVR CDR3序列；及(2)輕鏈可變區(LCVR)，該輕鏈可變區包含分別為圖2B中之單株抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之任一LCVR CDR1、CDR2及CDR3序列之LCVR CDR1序列、LCVR CDR2序列及LCVR CDR3序列。

【0092】 在某些實施例中，本發明之抗體包含(1)圖2A中之HFB2-4之HCVR CDR1序列、HCVR CDR2序列及HCVR CDR3序列；及(2)圖2B中之HFB2-4之(對應) LCVR CDR1序列、LCVR CDR2序列及LCVR CDR3序列。

【0093】 在某些實施例中，本發明之抗體為小鼠-人類嵌合抗體，該小鼠-人類嵌合抗體包含人類抗體(諸如hIgG1或hIgG2)之恆定區序列，及圖2A中之單株

抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之任一HCVR序列之HCVR；及圖2B中之單株抗體(例如HFB2-1、HFB2-2、HFB2-3、HFB2-4、HFB2-5及HFB2-6)之(對應)任一LCVR序列之LCVR。

【0094】 在某些實施例中，小鼠-人類嵌合抗體包含圖2A中之HFB2-4之HCVR序列，及圖2B中之HFB2-4之LCVR序列。

【0095】 在某些實施例中，本發明之抗體為人類化抗體。

【0096】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之單株抗體之HCVR CDR1序列、HCVR CDR2序列及HCVR CDR3序列；及(2)圖4B中之單株抗體之LCVR CDR1序列、LCVR CDR2序列及LCVR CDR3序列。

【0097】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之VH1、VH2及VH3序列之任一HCVR序列的構架區序列，及/或(2)圖4B中之VL1、VL2、VL3及VL4序列之任一LCVR序列的構架區序列。

【0098】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之VH3之構架區序列，及/或(2)圖4B中之VL1之構架區序列。

【0099】 在某些實施例中，人類化抗體包含：(1)圖4A中之VH3之構架區序列，及/或(2)圖4B中之VL4之構架區序列。

【0100】 在某些實施例中，本發明之抗體具有經修飾之Fc區以增強ADCC。舉例而言，在某些實施例中，本發明之抗體包含F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L突變以增強FcγRIIIa結合。在某些實施例中，本發明之抗體包含S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合(本文中之hIgG1-DE)。在某些實施例中，本發明之抗體包含S239D/I332E/A330L突變以同時增強FcγRIIIa結合且降低FcγRIIIb結合。在某些實施例中，本發明之抗體包含S298A/E333A/K334A突變以增強FcγRIIIa結合。

【0101】 在某些實施例中，本發明之抗體為人類化小鼠單株抗體，視情況，

抗體包含S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合(hIgG1-DE)。舉例而言，人類化單株抗體可藉由使小鼠單株抗體之CDR區CDR接枝至人類構架區中來產生。

【0102】 在某些實施例中，本發明之抗體的ADCC活性具有低(例如1-5或1-2) pM範圍EC50值。

【0103】 在某些實施例中，本發明之抗體針對表現表面hCXCR5之原代B細胞具有ADCC活性。

【0104】 在某些實施例中，本發明之抗體不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【0105】 在某些實施例中，本發明之抗體抑制cAMP信號傳導。

【0106】 在某些實施例中，本發明之抗體抑制趨化性(例如在約0.1-0.5 nM或約0.1 nM下具有約100%抑制)。

【0107】 在某些實施例中，本發明之抗體抑制hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【0108】 在某些實施例中，本發明之抗體對hCXCR5具特異性(例如與hCXCR3沒有或幾乎沒有交叉反應性。

【0109】 在某些實施例中，本發明之抗體結合至黏附細胞株(諸如DX002)及/或懸浮細胞株(諸如M300-19)上所表現之hCXCR5。

【0110】 在某些實施例中，本發明之抗體不與或最低限度地與hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物交叉反應。

【0111】 在某些實施例中，本發明之抗體降低個體中記憶B細胞群體之百分比。

【0112】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之休格蘭症候群(SS)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0113】 約25%之休格蘭症候群患者顯示異位生髮中心(GC)在唾液腺中具有

高CXCR5$^+$細胞浸潤，SS患者中之GC富含於產生CXCL13之Tfh細胞中，其將CXCR5$^+$ B細胞招募且分化至產生抗體之細胞中。已在小鼠SS模型中及人類疾病中發現CXCL13水準升高。此外，在休格蘭氏病之動物模型中已發現CXCL13之中和具保護性。

【0114】 在某些實施例中，該方法緩解SS之至少一種症狀。

【0115】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之淋巴瘤或白血病的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0116】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為B細胞淋巴瘤。

【0117】 在某些實施例中，B細胞淋巴瘤為CLL (B細胞慢性淋巴細胞性白血病)。

【0118】 在某些實施例中，淋巴瘤或白血病為非霍奇金氏淋巴瘤，諸如伯基特氏淋巴瘤。

【0119】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之具有異位生髮中心之疾病或適應症(包括自體免疫疾病或病症)的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0120】 在某些實施例中，疾病或適應症為類風濕性關節炎(RA)、系統性紅斑狼瘡(SLE)、乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn’s disease)、潰瘍性結腸炎、I型糖尿病、多發性硬化(MS)、類肉瘤病、銀屑病、重症肌無力、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto’s thyrioiditis)、格雷夫斯氏病(Grave’s disease)、動脈硬化、結膜炎、胃炎、肝炎或皮炎。

【0121】 本發明之另一態樣提供一種治療有需要之個體之實體癌症的方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體(例如本發明之人類化抗體)。

【0122】 在某些實施例中，實體癌症為胃癌、乳癌、腸癌、肺癌或前列腺癌。

【0123】 以下各個部分中進一步且單獨地描述本發明之詳細態樣。然而，應瞭解，本發明之任一實施例(包括僅描述於實例或圖式中之實施例及僅描述於以下一個部分中之實施例)可與本發明之任何其他實施例組合。

2. *定義*

【0124】 術語「抗體」廣義上涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體及多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。術語「抗體」亦可泛指包含重鏈之互補決定區(CDR) 1、CDR2及CDR3及輕鏈之CDR1、CDR2及CDR3的分子，其中該分子能夠結合至抗原。術語「抗體」亦包括但不限於嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體及各種物種(諸如小鼠、人類、食蟹猴等)之抗體。

【0125】 然而，在狹義上，「抗體」係指各種單株抗體，包括嵌合單株抗體、人類化單株抗體及人類單株抗體，尤其本發明之人類化單株抗體。

【0126】 在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區(HCVR)及輕鏈可變區(LCVR)。在一些實施例中，抗體包含至少一條重鏈(HC)，該至少一條重鏈包含重鏈可變區及至少一部分重鏈恆定區；及至少一條輕鏈(LC)，該至少一條輕鏈包含輕鏈可變區及至少一部分輕鏈恆定區。在一些實施例中，抗體包含兩條重鏈，其中各重鏈包含重鏈可變區及至少一部分重鏈恆定區；及兩條輕鏈，其中各輕鏈包含輕鏈可變區及至少一部分輕鏈恆定區。

【0127】 如本文所用，單鏈Fv (scFv)或包含例如包含所有六個CDR (三個重鏈CDR和三個輕鏈CDR)之單一多肽鏈的任何其他抗體均視為具有重鏈及輕鏈。在一些此類實施例中，重鏈為抗體中包含三個重鏈CDR之區域且輕鏈為抗體中包含三個輕鏈CDR之區域。

【0128】 如本文所用之術語「重鏈可變區(HCVR)」至少係指包含重鏈CDR1

(CDR-H1)、構架2 (HFR2)、CDR2 (CDR-H2)、FR3 (HFR3)及CDR3 (CDR-H3)之區域。在一些實施例中，重鏈可變區亦包含至少一部分(例如整個)之FR1 (HFR1)，其為CDR-H1之N端；及/或至少一部分(例如整個)之FR4 (HFR4)，其為CDR-H3之C端。

【0129】 如本文所用之術語「重鏈恆定區」係指包含至少三個重鏈恆定域CH1、CH2及CH3之區域。非限制性示例性重鏈恆定區包括γ、δ及α。非限制性示例性重鏈恆定區亦包括ε及μ。各重恆定區對應於抗體同型。舉例而言，包含γ恆定區之抗體為IgG抗體，包含δ恆定區之抗體為IgD抗體，包含α恆定區之抗體為IgA抗體，包含ε恆定區之抗體為IgE抗體，且包含μ恆定區之抗體為IgM抗體。

【0130】 某些同型可進一步再分成亞類。舉例而言，IgG抗體包括但不限於IgGl (包含γ1恆定區)、IgG2 (包含γ2恆定區)、IgG3 (包含γ3恆定區)及IgG4 (包含γ4恆定區)抗體；IgA抗體包括但不限於IgA1 (包含α1恆定區)及IgA2 (包含α2恆定區)抗體；且IgM抗體包括但不限於IgM1 (包含μ1恆定區)及IgM2 (包含μ2恆定區)。

【0131】 如本文所用之術語「重鏈」係指具有或不具有前導序列之至少包含重鏈可變區之多肽。在一些實施例中，重鏈包含至少一部分之重鏈恆定區。如本文所用之術語「全長重鏈」係指具有或不具有前導序列且具有或不具有C端離胺酸之包含重鏈可變區及重鏈恆定區之多肽。

【0132】 如本文所用之術語「輕鏈可變區(LCVR)」係指包含輕鏈CDR1 (CDR-L1)、構架(FR)2 (LFR2)、CDR2 (CDR-L2)、FR3 (LFR3)及CDR3 (CDR-L3)之區域。在一些實施例中，輕鏈可變區亦包含至少一部分(例如整個)之FR1 (LFR1)及/或至少一部分(例如整個)之FR4 (LFR4)。

【0133】 如本文所用之術語「輕鏈恆定區」係指包含輕鏈恆定域C_L之區域。

非限制性示例性輕鏈恆定區包括λ及κ。

【0134】 如本文所用之術語「輕鏈」係指具有或不具有前導序列之至少包含輕鏈可變區之多肽。在一些實施例中，輕鏈包含至少一部分之輕鏈恆定區。如本文所用之術語「全長輕鏈」係指具有或不具有前導序列之包含輕鏈可變區及輕鏈恆定區之多肽。

【0135】 術語「抗體片段」或(抗體之)「抗原結合部分」包括但不限於能夠結合抗原之片段，諸如Fv、單鏈Fv (scFv)、Fab、Fab'及$(Fab')_2$。在某些實施例中，抗體片段包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【0136】 術語「Fab」係指分子量為約50,000道耳頓之抗體片段，且具有結合至抗原之活性。其包含藉由二硫鍵連接之重鏈之約一半之N端側及整個輕鏈。Fab可特定而言藉由用蛋白酶木瓜蛋白酶處理免疫球蛋白來獲得。

【0137】 術語「$F(ab')_2$」命名約100,000道耳頓且具有結合至抗原之活性的片段。此片段稍微大於鉸鏈區中經由二硫鍵連接之兩個Fab片段。此等片段藉由用蛋白酶胃蛋白酶處理免疫球蛋白來獲得。Fab片段可藉由鉸鏈區之二硫鍵之裂解自F(ab')2片段獲得。

【0138】 單一Fv鏈「scFv」對應於使用編碼VL及VH域之基因及編碼旨在結合此等結構域之肽的序列合成之VH:VL多肽。根據本發明之scFv包括例如使用基因重組技術維持適當構象之CDR。

【0139】 「scFv」之二聚體對應於藉由肽鍵連接在一起之兩個scFv分子。此Fv鏈常常為包括編碼藉由編碼肽之連接子序列連接之VH及VL之基因的融合基因表現之結果。人類scFv片段可包括較佳藉助於使用基因重組技術維持適當構象之CDR區。

【0140】 「dsFv」片段為藉由二硫鍵穩定之VH-VL異二聚體；其可為二價的($dsFV_2$)。二價$Sc(Fv)_2$或多價抗體之片段可藉由單價scFv之締合自發形成或藉由用肽結合序列連接scFv片段而產生。

【0141】 Fc片段支持抗體之生物特性，尤其其由免疫性效應子識別或活化補體之能力。其由鉸鏈區外重鏈之恆定片段組成。

【0142】 術語「雙抗體」意指具有兩個抗原固定位點之小抗體片段。此等片段在同一VH-VL多肽鏈中包含連接至可變輕鏈結構域VL之可變重鏈結構域VH。使用太短而不允許同一鏈之兩個結構域相匹配之結合序列，必然地發生與另一鏈之兩個互補結構域相匹配且因此形成兩個抗原固定位點。

【0143】 與參考抗體「結合至相同抗原決定基之抗體」可藉由抗體競爭分析來確定。其係指在競爭分析中將參考抗體與其抗原之結合阻斷50%或更多，且相反地，在競爭分析中參考抗體將抗體與其抗原之結合阻斷50%或更多之抗體。當在競爭相同抗原決定基之抗體的背景下使用時，術語「競爭」意指藉由其中正在測試之抗體阻止或抑制參考抗體與共同抗原之特異性結合之分析來確定抗體之間的競爭。

【0144】 可使用許多類型之競爭性結合分析，例如：固相直接或間接放射免疫分析(RIA)、固相直接或間接酶免疫分析(EIA)、夾心競爭分析(參見例如Stahli等人, 1983, Methods in Enzymology 9:242-253)；固相直接生物素-親和素EIA (參見例如Kirkland等人, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619)；固相直接標記分析；固相直接標記夾心分析(參見例如Harlow及Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press)；使用I^{125}標記之固相直接標記RIA (參見例如Morel等人, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15)；固相直接生物素-親和素EIA (參見例如Cheung等人, 1990, Virology 176:546-552)；及直接標記RIA (Moldenhauer等人, 1990, Scand. J. Immunol.)。

【0145】 典型地，此類分析涉及使用結合至固體表面之經純化之抗原或帶有此等抗原中之任一者的細胞、未經標記之測試抗原結合蛋白及經標記之參考抗體。競爭性抑制藉由確定在存在測試抗體之情況下結合至固體表面或細胞之標記的量來量測。通常測試抗體以過量存在。藉由競爭分析(競爭抗體)鑑定之抗體包括與參考抗體結合至相同抗原決定基之抗體及結合至足夠靠近由參考抗體結合之抗原決定基的相鄰抗原決定基從而發生空間位阻之抗體。在一些實施例中，當競爭抗體以過量存在時，其將抑制參考抗體與共同抗原之特異性結合達至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些情況下，抑制結合達至少80%、85%、90%、95%或97%或更多。

【0146】 術語「抗原」係指能夠由選擇性結合劑(諸如抗體或其免疫功能片段)結合且另外能夠在哺乳動物中用於產生能夠結合至彼抗原之抗體的分子或分子之一部分。抗原可具有一或多個能夠與抗體相互作用之抗原決定基。

【0147】 術語「抗原決定基」為抗原分子中由選擇性結合劑(諸如抗體或其片段)結合之部分。該術語包括能夠特異性結合於抗體之任何決定位。抗原決定基可為連續或非連續的(例如在多肽中，在多肽序列中不彼此鄰接但在分子之背景內由抗原結合蛋白結合的胺基酸殘基)。在一些實施例中，抗原決定基可為模擬物，因為其包含類似於用於產生抗體之抗原決定基的三維結構，而不包含任何或僅包含一些在彼抗原決定基中被發現用於產生抗體之胺基酸殘基。抗原決定基決定位可包括分子之化學活性表面基團，諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且可具有特定三維結構特徵及/或比電荷特徵。

【0148】 在一些實施例中，「抗原決定基」藉由用於確定它之方法來定義。舉例而言，在一些實施例中，若如藉由氫-氘交換(HDX)所確定，抗體與參考抗體結合至抗原之相同區域，則抗體與參考抗體結合至相同抗原決定基。

【0149】 在某些實施例中，若如藉由X-射線晶體照像術所確定，抗體與參考

抗體結合至抗原之相同區域，則抗體與參考抗體結合至相同抗原決定基。

【0150】 如本文所用之「嵌合抗體」係指包含來自第一物種(諸如小鼠、大鼠、食蟹猴等)之至少一個可變區及來自第二物種(諸如人類、食蟹猴、雞等)之至少一個恆定區的抗體。在一些實施例中，嵌合抗體包含至少一個小鼠可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中，嵌合抗體之所有可變區來自第一物種且嵌合抗體之所有恆定區來自第二物種。

【0151】 如本文所用之「人類化抗體」係指其中非人類可變區(諸如小鼠、大鼠、食蟹猴、雞等)之構架區中之至少一個胺基酸已經來自人類可變區之對應胺基酸置換的抗體。在一些實施例中，人類化抗體包含至少一個人類恆定區或其片段。在一些實施例中，人類化抗體片段為Fab、scFv、$(Fab')_2$等。

【0152】 如本文所用之「CDR接枝抗體」係指其中第一(非人類)物種之一或多個互補決定區(CDR)已接枝至第二(人類)物種之構架區(FR)上的人類化抗體。

【0153】 如本文所用之「人類抗體」係指人類中產生之抗體、包含人類免疫球蛋白基因之非人類動物(諸如XENOMOUSE®)中產生之抗體及使用體外方法(諸如噬菌體展示)選擇之抗體，其中抗體譜係基於人類免疫球蛋白序列。

【0154】 具有「增強之ADCC活性」之抗體包括當與對照或親本抗體相比時且當分析中所用之此類抗體與對照/親本抗體之量基本上相同時更有效介導活體外或活體內ADCC之抗體，其中該抗體與對照/親本抗體在至少一種結構態樣中有所不同。在一些實施例中，抗體與對照/親本抗體具有相同胺基酸序列，但抗體為非海藻糖基化的，而親本抗體為海藻糖基化的。ADCC活性可使用任何此項技術認可之方法來測定。在一些實施例中，ADCC活性使用如本文揭示之活體外ADCC分析來測定，但涵蓋用於測定ADCC活性之其他分析或方法，例如在動物模型中等。在一些實施例中，具有增強之ADCC活性的抗體對FcγRIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，具有增強之ADCC活性之抗體對

FcγRIIIA (V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，具有增強之ADCC活性之抗體對FcγRIIIA (F158)具有增強之親和力。

【0155】 具有「改變」之FcR結合親和力或ADCC活性之抗體為與對照/親本抗體相比具有增強或減少之FcR結合活性及/或ADCC活性之抗體，其中該抗體與親本抗體在至少一種結構態樣中有所不同。

【0156】 「展示增加之與FcR之結合」之抗體與親本抗體相比以更佳之親和力結合至少一種FcR。

【0157】 「展示降低之與FcR之結合」之抗體與親本抗體相比以更低之親和力結合至少一種FcR。此類展示降低之與FcR之結合之抗體可幾乎沒有可感知之與FcR之結合，例如與天然序列IgG Fc區相比0-20%之與FcR之結合。

【0158】 「增強之對FcγRIIIA之親和力」係指抗體與對照/親本抗體相比具有更大之對Fcγ RIIIA (在一些情況下，亦稱為CD 16a)之親和力，其中該抗體與親本抗體在至少一種結構態樣中有所不同。在一些實施例中，抗體與對照/親本抗體具有相同胺基酸序列，但抗體為非海藻糖基化的，而對照/親本抗體為海藻糖基化的。可使用任何適合用於確定對FcγRIIIA之親和力之方法。在一些實施例中，藉由本文所描述之方法來確定對FcγRIIIA之親和力。在一些實施例中，對FcγRIIIA具有增強之親和力之抗體具有增強之ADCC活性。在一些實施例中，對FcγRIIIA具有增強之親和力之抗體對FcγRIIIA (V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，對FcγRIIIA具有增強之親和力之抗體對FcγRIIIA (F158)具有增強之親和力。

【0159】 「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指目標細胞在存在補體之情況下溶解。經典補體路徑之活化係因補體系統(Clq)之第一組分結合至與其同源抗原結合之抗體(屬於適當子類)而起始。為了評估補體活化，可進行例如如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202: 163, 1996中所描述之CDC分析。

具有改變之Fc區胺基酸序列及增加或降低之Clq結合能力的抗體描述於例如美國專利第6,194,551 B1號、美國專利第7,923,538號、美國專利第7,994,290號及WO 1999/51642中。

【0160】 「宿主細胞」係指可為或已為載體或分離之聚核苷酸之接受者的細胞。宿主細胞可為原核細胞或真核細胞。示例性真核細胞包括哺乳動物細胞，諸如靈長類或非靈長類動物細胞；真菌細胞，諸如酵母；植物細胞；以及昆蟲細胞。非限制性示例性哺乳動物細胞包括但不限於NSO細胞、PER.C6®細胞(Crucell)以及293及CHO細胞及其衍生物，分別諸如293-6E及DG44細胞。

【0161】 如本文所用之術語「分離」係指分子已與典型地與其一起存在於自然界中之至少一些組分分離或已與典型地與其一起產生之至少一些組分分離。舉例而言，當多肽與產生它之細胞之至少一些組分分離時，將該多肽稱為「分離的」。在多肽於表現之後由細胞分泌之情況下，以物理方式將含有該多肽之上清液與產生它之細胞分離被視為「分離」該多肽。類似地，當聚核苷酸不為典型地在自然界中它在其中被發現之更大聚核苷酸的一部分(諸如在DNA聚核苷酸之情況下為基因組DNA或粒線體DNA)，或與產生它之細胞之至少一些組分分離(例如在RNA聚核苷酸之情況下)時，將該聚核苷酸稱為「分離的」。因此，只要宿主細胞內部之載體中所含之DNA聚核苷酸在自然界中不存在於該載體中，即可將彼聚核苷酸稱為「分離的」。

【0162】 術語「個體」及「患者」在本文中可互換地用於指哺乳動物，諸如人類。在一些實施例中，亦提供治療其他非人類哺乳動物之方法，該等其他非人類哺乳動物包括但不限於囓齒動物、猴、貓、犬、馬、牛、豬、綿羊、公山羊、哺乳動物實驗室動物、哺乳動物農場動物、哺乳動物運動動物及哺乳動物寵物。在一些情況下，「個體」或「患者」係指需要針對疾病或病症進行治療之(人類)個體或患者。

【0163】 如本文所用，術語「樣品」或「患者樣品」係指獲自或來源於含有要例如基於物理、生物化學、化學及/或生理特徵進行表徵及/或鑑定之細胞及/或其他分子實體之相關個體之材料。舉例而言，片語「疾病樣品」及其變化型式係指獲自將預期含有或已知含有所要表徵之細胞及/或分子實體之相關個體的任何樣品。

【0164】 「組織或細胞樣品」意指獲自個體或患者之組織之類似細胞的集合。組織或細胞樣品之來源可為如來自新鮮、冷凍及/或保存之器官或組織樣品或活組織切片或抽出物之實體組織；血液或任何血液組成；人體流體，諸如痰液、腦脊髓液、羊水、腹膜液或間隙液；妊娠或個體發育中任何時間之細胞。組織樣品亦可為原代或經培養之細胞或細胞株。視情況，組織或細胞樣品獲自疾病組織/器官。組織樣品可含有本質上不與組織天然混合之化合物，諸如防腐劑、抗凝劑、緩衝劑、固定劑、營養物、抗生素或類似物。

【0165】 如本文所用，「參考樣品」、「參考細胞」或「參考組織」係指獲自已知或咸信未受使用本發明之方法或組合物鑑定之疾病或疾患折磨之來源的樣品、細胞或組織。在一個實施例中，參考樣品、參考細胞或參考組織獲自使用本發明之組合物或方法鑑定疾病或疾患之相同個體或患者之身體的健康部分。在一個實施例中，參考樣品、參考細胞或參考組織獲自不為使用本發明之組合物或方法鑑定疾病或疾患之個體或患者的至少一個個體之身體的健康部分。在一些實施例中，參考樣品、參考細胞或參考組織先前在發展疾病或疾患之前或在疾病或疾患早期自患者獲得。

【0166】 「病症」或「疾病」為將受益於使用本發明之一或多種Gal-9拮抗劑之治療的任何疾患。此包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易感染所討論之病症的彼等病理學疾患。本文中要治療之病症的非限制性實例包括癌症。

【0167】 術語「癌症」在本文中用於指展現異常高水準之增殖及生長的一群細胞。癌症可為良性的(也稱為良性腫瘤)、惡化前或惡性的。癌細胞可為實體癌症細胞(亦即形成實體腫瘤)或白血病性癌細胞。術語「癌症生長」在本文中用於指包含引起對應之癌症尺寸或程度增加之癌症之細胞的增殖或生長。

【0168】 癌症之實例包括但不限於癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤以及白血病。此類癌症之更特定非限制性實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食管癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸道癌、胰腺癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney cancer/renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、腦癌、子宮內膜癌、睾丸癌、膽管細胞癌、膽囊癌、胃癌、黑素瘤及各種類型之頭頸癌。

【0169】 在某些實施例中，如本文所用之癌症包括血液癌(諸如淋巴瘤或白血病，包括CLL、伯基特氏淋巴瘤)或實體腫瘤(諸如乳癌、肺癌及前列腺癌)。

【0170】 「化學治療劑」為可用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括但不限於烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸鹽，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮雜環丙烷，諸如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥多巴(meturedopa)及烏瑞多巴(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基蜜胺，包括六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基蜜胺；多聚乙醯(尤其布拉它辛(bullatacin)及布拉它辛酮)；喜樹鹼(包括合成類似物拓撲替康(topotecan))；蕾司他汀(bryostatin)；卡利他汀(callystatin)；CC-1065 (包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；克拉特非辛(cryptophycin) (特定而言克拉特非辛1及克拉特非辛8)；多拉司他汀

(dolastatin)；多卡黴素(duocarmycin)(包括合成類似物，KW-2189及CB1-TM1)；伊斯羅賓(eleutherobin)；水鬼蕉鹼；匍枝珊瑚醇；海綿抑素；氮芥，諸如氮芥苯丁酸、萘氮芥、膽磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、二氯甲基二乙胺氧化物鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、膽固醇苯乙酸氮芥、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥；硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimnustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如加利車黴素(calicheamicin)，尤其加利車黴素γll及加利車黴素δll (參見例如Agnew, Chem lntl. Ed. Engl , 33: 183-186 (1994))；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯膦酸鹽；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新制癌菌素髮色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomysin)、放線菌素、安麴黴素(authramycin)、氮雜絲胺酸、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C、卡拉比星(carabicin)、洋紅黴素、嗜癌黴素、色黴素、更生黴素(dactinomycin)、柔紅比星(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin) (包括嗎啉基-多柔比星、氰基嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及去氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素、培洛黴素(peplomycin)、泊非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、三鐵阿黴素、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素、鏈佐星(streptozocin)、殺結核菌素、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如胺甲喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如二甲葉酸、胺甲喋呤、蝶羅呤、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌

吟、硫咪嘌呤、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如環胞苷、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷；雄激素，諸如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸鹽(dromostanolone propionate)、表硫雄醇、美雄酮(mepitiostane)、睾內酯；抗腎上腺物，諸如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸酸；乙醯葡醛內酯；醛磷醯胺醣苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；倍曲布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；多弗醯胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；依洛尼塞(elfomithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；埃博黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎵；羥基脲；香菇多糖；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidanmol)；尼曲吖啶(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；蛋氨氮芥；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；足葉草酸；2-乙肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根黴素；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺；細交鏈孢菌酮酸；三亞胺醌；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、疣孢菌素A、桿孢菌素A及蛇形菌素)；胺基甲酸酯；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；類紫杉醇，例如TAXOL®帕西他賽(paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE®不含克列莫佛(Cremophor)之帕西他賽白蛋白工程化奈米粒子調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)及TAXOTERE®多西他賽(doxetaxel) (Rhone-Poulenc Rorer, Antony,

France)；苯丁酸氮芥；GEMZAR®吉西他濱(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巰基嘌呤；胺甲喋呤；鉑類似物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春花鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；NAVELBINE®長春瑞濱(vinorelbine)；雙羥蒽醌；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙；道諾黴素(daunomycin)；胺基喋呤；截瘤達(xeloda)；依班膦酸鹽(ibandronate)；伊立替康(irinotecan) (Camptosar，CPT-11) (包括伊立替康加5-FU及亞葉酸之治療方案)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃醇，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；考布他汀(combretastatin)；亞葉酸(LV)；奧沙利鉑，包括奧沙利鉑治療方案(FOLFOX)；PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR之抑制劑(例如埃羅替尼(erlotinib) (TARCEVA®)))及減少細胞增殖之VEGF-A及以上中之任一者的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

【0171】 其他非限制性示例性化學治療劑包括起作用以調控或抑制激素對癌症之作用的抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抑制調控腎上腺中之雌激素產生的芳香酶之芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE®甲地孕酮乙酸酯、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美斯坦(formestanie)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏羅唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole)；及抗雄激素，諸如氟他米特(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡米特(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；以及曲沙他濱(troxacitabine) (1,3-二氧雜環戊烷核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，特定而言

抑制異常細胞增殖中所涉及之信號傳導通道中之基因(諸如PKC-α、Ralf及H-Ras)之表現的反義寡核苷酸；核糖酶，諸如VEGF表現抑制劑(例如ANGIOZYME®核糖酶)及HER2表現抑制劑；疫苗，諸如基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；及以上中之任一者的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

【0172】 「抗血管生成劑」或「血管生成抑制劑」係指直接或間接抑制血管生成、血管發生或不希望之血管通透性之小分子量物質、聚核苷酸(包括例如抑制RNA (RNAi或siRNA))、多肽、分離之蛋白質、重組蛋白、抗體或其結合物或融合蛋白。應瞭解，抗血管生成劑包括結合及阻斷血管生成因子或其受體之血管生成活性的彼等藥劑。舉例而言，抗血管生成劑為針對血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如針對VEGF-A (例如貝伐單抗(bevacizumab) (AVASTIN®))或針對VEGF-A受體(例如KDR受體或Flt-1受體)之抗體、抗PDGFR抑制劑(諸如GLEEVEC® (伊馬替尼甲磺酸鹽(Imatinib Mesylate)))、阻斷VEGF受體信號傳導之小分子(例如PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT®/SUl 1248 (舒尼替尼蘋果酸鹽(sunitinib malate))、AMG706或例如國際專利申請案WO 2004/113304中所描述之彼等小分子)。抗血管生成劑亦包括天然血管生成抑制劑，例如血管抑素、內皮抑素等。參見例如Klagsbrun及D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39；Streit及Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179 (例如表3列舉惡性黑素瘤中之抗血管生成療法)；Ferrara及Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12): 1359-1364；Tonini等人(2003) Oncogene 22:6549-6556 (例如表2列舉已知抗血管生成因子)；及Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206 (例如表1列舉臨床試驗中所用之抗血管生成劑)。

【0173】 如本文所用之「生長抑制劑」係指抑制細胞(諸如表現VEGF之細胞)

活體外或活體內生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S階段中之細胞(諸如表現VEGF之細胞)的百分比的藥劑。生長抑制劑之實例包括但不限於阻斷細胞週期進展(在除S階段外之位置)之藥劑，諸如誘導G1抑制及M階段抑制之藥劑。經典M階段阻斷劑包括長春花(長春新鹼及長春花鹼)、紫杉烷及拓撲異構酶II抑制劑，諸如多柔比星、表柔比星、柔紅比星、依託泊苷及博來黴素。抑制G1之彼等劑亦溢出至S階段抑制中，例如DNA烷基化劑，諸如他莫昔芬、潑尼松(prednisone)、達卡巴嗪、二氯甲基二乙胺、順鉑、胺甲喋呤、5-氟尿嘧啶及阿糖胞苷。其他資訊可見於Mendelsohn及Israel編, The Molecular Basis of Cancer, 第1章, 標題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」, Murakami等人(W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)，例如第13頁中。紫杉烷(帕西他賽及多西他賽)為來源於紫杉樹之抗癌藥。來源於歐洲紫杉之多西他賽(TAXOTERE®， Rhone-Poulenc Rorer)為帕西他賽(TAXOL®， Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。帕西他賽及多西他賽促進來自微管蛋白二聚體之微管的組裝且藉由防止解聚來穩定微管，此產生對細胞中之有絲分裂的抑制。

【0174】 術語「抗贅生組合物」係指包含至少一種活性治療劑之適用於治療癌症之組合物。治療劑之實例包括但不限於例如化學治療劑、生長抑制劑、細胞毒性劑、放射療法中所用之藥劑、抗血管生成劑、癌症免疫治療劑(亦稱為免疫腫瘤劑)、凋亡劑、抗微管蛋白劑及用於治療癌症之其他藥劑，諸如抗HER-2抗體、抗CD20抗體、表皮生長因子受體(EGFR)拮抗劑(例如酪胺酸激酶抑制劑)、HER1/EGFR抑制劑(例如埃羅替尼(TARCEVA®)、血小板源性生長因子抑制劑(例如GLEEVEC® (伊馬替尼甲磺酸鹽))、COX-2抑制劑(例如塞來昔布(celecoxib))、干擾素、CTLA4抑制劑(例如抗CTLA抗體伊匹單抗(ipilimumab)(YERVOY®))、PD-1抑制劑(例如抗PDl抗體、BMS-936558)、PDL1抑制劑(例如抗PDLl抗體、MPDL3280A)、PDL2抑制劑(例如抗PDL2抗體)、VISTA抑制劑

(例如抗VISTA抗體)、細胞因子、結合至目標ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4、VISTA或VEGF受體中之一者或多者的拮抗劑(例如中和抗體)、TRAIL/Apo2及其他生物活性及有機化學藥劑等。其組合亦包括於本發明中。

【0175】 「治療」係指治療性治療，例如其中目標為減慢(減輕)靶向之病理性疾患或病症，以及其中目標為抑制疾患或病症復發。「治療」涵蓋因哺乳動物(包括人類)之疾病(本文中亦稱為「病症」或「疾患」)而進行的治療劑之任何投與或施加，且包括抑制疾病或疾病進展、抑制或減慢疾病或其進展、抑制其發展、部分或完全緩解疾病、部分或完全緩解疾病之一或多種症狀或恢復或修復損失、丟失或有缺陷之功能；或刺激低效過程。術語「治療」亦包括降低任何表型特徵之嚴重程度及/或降低該特徵之發生率、程度或可能性。需要治療之彼等患者包括彼等已患有病症之患者以及彼等處於病症復發之風險中之患者或彼等要預防或減慢病症復發之患者。

【0176】 術語「有效量」或「治療有效量」係指藥物有效治療個體之疾病或病症之量。在一些實施例中，有效量係指在必要劑量下且持續必要時間段有效實現所需治療或預防結果之量。本發明之抗體之治療有效量可根據諸如疾病狀態、個體之年齡、性別及體重及拮抗劑在個體中引發所需反應之能力等因素而改變。治療有效量涵蓋其中本發明抗體之任何毒性或有害作用均被治療有益效應超過之量。

【0177】 「預防有效量」係指在必要之劑量下且持續必要時間段有效實現所需預防結果之量。典型地，但不一定，由於預防劑量係在疾病之前或早期在個體中使用，故預防有效量將小於治療有效量。

【0178】 「醫藥學上可接受之載劑」係指無毒之固體、半固體或液體填料、稀釋劑、囊封材料、調配助劑或習知在此項技術中與治療劑一起使用之載劑，

該載劑與治療劑一起構成用於向個體投與之「醫藥組合物」。醫藥學上可接受之載劑在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒且與調配物之其他成分相容。醫藥學上可接受之載劑適合於所採用之調配。舉例而言，若要經口投與治療劑，則載劑可為凝膠膠囊。若要皮下投與治療劑，則載劑理想地對皮膚沒有刺激性且不引起注射部位之反應。

【0179】 「製品」為任何制造物(例如包裝或容器)或套組，其包含至少一種試劑，例如用於治療疾病或病症之藥劑，或用於特定而言偵測本文所描述之生物標記物的探針。在一些實施例中，以用於進行本文所描述之方法的單元之形式對製造物或套組進行促銷、分配或出售。

3. 使用方法，諸如治療癌症之方法

【0180】 本文所描述之發明提供用於治療人類及其他非人類哺乳動物之方法中的抗CXCR5抗體。

【0181】 在一些實施例中，提供用於治療或預防癌症之方法，該等方法包括向需要此類治療之個體投與有效量之本發明抗CXCR5抗體或其抗原結合片段中之任一者。

【0182】 在一些實施例中，提供治療癌症之方法，其中該等方法包括向患有癌症之個體投與本發明抗CXCR5抗體或其抗原結合片段中之任一者。

【0183】 可藉由本發明之方法/用途治療之癌症包括本文/上文所描述之彼等癌症中之任一者。

【0184】 本文提供可使用本發明抗CXCR5抗體或其抗原結合片段中之任一者治療之非限制性示例性癌症，包括癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。此類癌症之更特定非限制性實例包括黑素瘤、子宮頸癌、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食管癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸道癌、胰腺癌、膠質母細胞瘤、卵巢癌、

肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney cancer/renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、腦癌、子宮內膜癌、睾丸癌、膽管細胞癌、膽囊癌、胃癌、黑素瘤及各種類型之頭頸癌。

【0185】 在某些實施例中，癌症為黑素瘤、乳癌、結腸癌、子宮頸癌、腎癌、肝癌(例如肝細胞癌)、肺癌(NSCLC)、卵巢癌、皮膚癌(例如鱗狀細胞癌或基底細胞癌)、淋巴瘤或白血病。

【0186】 在一些實施例中，本發明之抗CXCR5抗體可單獨使用，或者與已知能夠治療疾病或適應症之任何其他合適之化合物(例如抗癌劑)組合使用。

【0187】 換句話說，當用途為治療癌症時，抗體可與針對癌症之已知療法(諸如手術、放射療法、化學療法或其組合)組合使用。舉例而言，抗體可與過繼性免疫療法組合使用，該過繼性免疫療法由一或多次注射針對腫瘤性抗原(特定而言EBV抗原)之效應淋巴細胞組成。根據一些態樣，與根據本發明用於癌症療法之針對CXCR5之抗體組合使用之其他抗癌劑包括抗血管生成劑。根據某些態樣，抗體可與細胞因子(例如刺激抗腫瘤免疫反應之細胞因子)共投與。

【0188】 在此類組合療法中，本發明之抗體可在第二治療劑之前、之後或與其同時使用。關於組合療法參見以下其他部分。

【0189】 本發明之一個相關態樣提供一種降低CXCR5活性之方法，該方法包括向有需要之個體治療投與有效量之如本文所描述之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0190】 本發明之一個相關態樣提供一種治療炎性疾病之方法，該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0191】 本發明之一個相關態樣提供一種治療需要免疫抑制之個體的方法，

該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0192】 本發明之一個相關態樣提供一種治療自體免疫疾病、病症或疾患之方法，該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0193】 本發明之一個相關態樣提供一種降低有需要之個體中表現CXCR5之細胞的數目之方法，該方法包括向個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0194】 在某些實施例中，細胞在其表面表現CXCR5。在某些實施例中，細胞為B細胞及Tfh樣細胞。

【0195】 在某些實施例中，個體為人類。

【0196】 在某些實施例中，該方法包括靜脈內或皮下投與抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0197】 在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段或醫藥組合物係約每週兩次、每週一次、每兩週一次、每三週一次、每四週一次、每五週一次、每六週一次、每七週一次、每八週一次、每九週一次、每十週一次、每月兩次、每月一次、每兩個月一次、每三個月一次、每四個月一次、每五個月一次、每六個月一次、每七個月一次、每八個月一次、每九個月一次、每十個月一次、每十一個月一次或每十二個月一次地進行投與。

【0198】 本發明之一個相關態樣提供一種降低之樣品中CXCR5+細胞之數目的方法，該方法包括使該細胞與本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物接觸。

【0199】 本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用作藥劑。

【0200】 本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用於降低個體中之CXCR5的活性。

【0201】 本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用於治療需要免疫抑制之個體。

【0202】 本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物，以用於治療個體之自體免疫疾病、病症或疾患。

【0203】 本發明之一個相關態樣提供本發明之抗體或其抗原結合片段在用於治療免疫性疾病、病症或疾患之藥劑之製造中的用途。

【0204】 本發明之一個相關態樣提供本發明之醫藥組合物在用於治療免疫性疾病、病症或疾患之藥劑之製造中的用途。

【0205】 本發明之一個相關態樣提供一種治療醫學疾患之方法，該方法包括向有需要之個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0206】 在某些實施例中，疾患選自由以下組成之群：炎性反應，諸如炎性皮膚疾病，包括銀屑病及皮炎(例如異位性皮炎)；皮肌炎；系統性硬皮病及硬化；與炎性腸道疾病(諸如克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)相關之反應；呼吸窘迫症候群(包括成人呼吸窘迫症候群；ARDS)；皮炎；腦膜炎；腦炎；葡萄膜炎；結腸炎；胃炎；腎小球性腎炎；過敏性疾患，諸如濕疹及哮喘及涉及T細胞浸潤之其他疾患及慢性炎性反應；動脈粥樣硬化；白細胞黏附缺陷；類風濕性關節炎；系統性紅斑狼瘡(SLE)；糖尿病(例如I型糖尿病或胰島素依賴型糖尿病)；多發性硬化；雷諾氏症候群(Reynaud's syndrome)；自體免疫甲狀腺炎；過敏性腦脊髓炎；休格蘭症候群；幼年發作型糖尿病；及與由典型地存在於結核病、類肉瘤病、多肌炎、肉芽腫病及血管炎中之細胞因子及T-淋巴細胞介導的急性及遲發過敏性相關之免疫反應；韋格納氏病(Wegener's disease)；惡性貧血

(阿狄森氏病(Addison's disease))；涉及白細胞血球滲出之疾病；中樞神經系統(CNS)炎性病症；多器官損傷症候群；溶血性貧血(包括但不限於冷沈球蛋白血症或庫姆斯試驗陽性貧血(Coombs positive anemia))；重症肌無力；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜疾病；抗磷脂症候群；過敏性神經炎；格雷夫斯氏病；蘭伯特-伊頓肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)；大皰性類天疱瘡；天疱瘡；自體免疫多內分泌腺病；白斑病；萊特爾氏病(Reiter's disease)；僵人症候群；白塞氏病(Bechet disease)；巨細胞性動脈炎；免疫複合物性腎炎；IgA腎病變；IgM多發性神經病變；免疫血小板減少性紫癜(ITP)或自體免疫血小板減少症及自體免疫溶血性疾病；橋本氏甲狀腺炎；自體免疫肝炎；自體免疫血友病；自體免疫淋巴增生性症候群(ALPS)；自體免疫葡萄膜視網膜炎；格林-巴利症候群(Guillain-Barre syndrome)；古巴士德氏症候群；混合結締組織病；自體免疫相關不孕症；多發性結節性動脈炎；斑禿；自發性黏液性水腫；移植物抗宿主疾病；肌營養不良(杜興氏(Duchenne)肌營養不良、貝克爾(Becker)肌營養不良、肌強直性肌營養不良、肢帶型肌營養不良、面肩肱型肌營養不良、先天性肌營養不良、眼咽型肌營養不良、遠端型肌營養不良、埃-德型(Emery-Dreifuss)肌營養不良)以及控制表現CXCR5之癌細胞(諸如胰腺癌、結腸癌、膀胱癌、T細胞白血病及B細胞白血病)之增殖。在某些實施例中，疾病為SLE或類風濕性關節炎。

【0207】 在某些實施例中，疾病為休格蘭症候群。

【0208】 本發明之一個相關態樣提供一種使用本發明之抗體或其抗原結合片段或其醫藥組合物偵測樣品、組織或細胞中之CXCR5之方法，該方法包括使樣品、組織或細胞與抗體接觸及偵測抗體。

【0209】 本發明之一個相關態樣提供一種使用本發明之抗體或其抗原結合片段偵測樣品、組織或細胞中之CXCR5之方法，該方法包括使樣品、組織或細胞

與抗體接觸及偵測抗體。

【0210】 本發明之一個相關態樣提供一種抑制有需要之個體中之體液免疫反應之方法，該方法包括投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段，或其醫藥組合物。

【0211】 在某些實施例中，抗體介導選自由以下組成之群的至少一種表現CXCR5之細胞之消耗：脾臟中之Tfh細胞、外周血中之B細胞及外周血中之Tfh樣細胞。

4. 投藥途徑及載劑

【0212】 在各個實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可皮下或靜脈內投與。為簡單起見，「本發明抗CXCR5單株抗體」係指本發明之小鼠-人類嵌合抗CXCR5抗體，以及其人類化變異體。

【0213】 在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可藉由各種途徑在活體內投與，包括但不限於經口、動脈內、非經腸、鼻內、肌肉內、心內、心室內、氣管內、經頰、經直腸、腹膜內、藉由吸入、真皮內、經表面、經真皮及鞘內，或以其他方式，例如藉由植入。

【0214】 在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可經由靜脈內或皮下方式投與。

【0215】 本發明抗體組合物可調配成呈固體、半固體、液體或氣態形式之製劑；包括但不限於錠劑、膠囊、粉末、顆粒、軟膏、溶液、栓劑、灌腸劑、注射劑、吸入劑及氣溶膠。

【0216】 在各個實施例中，包含本發明抗CXCR5單株抗體之組合物與多種醫藥學上可接受之載劑一起提供於調配物中(參見例如Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 第20版(2003)；Ansel等人, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第

7版，Lippencott Williams and Wilkins (2004)；Kibbe等人，Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, Pharmaceutical Press (2000))。包括媒劑、佐劑及稀釋劑之各種醫藥學上可接受之載劑為可獲得的。此外，各種醫藥學上可接受之助劑物質，諸如pH值調節及緩衝劑、張力調節劑、穩定劑、潤濕劑及類似物亦為可獲得的。非限制性示例性載劑包括鹽水、緩衝鹽水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其組合。

【0217】 在各個實施例中，包含本發明抗CXCR5單株抗體之組合物可經調配用於注射，包括藉由將其溶解、懸浮或乳化於水性或非水溶劑(諸如植物油或其他油、合成脂族酸甘油酯、高碳脂肪酸之酯或丙二醇)中來進行皮下投與；且(若需要)具有習知添加劑，諸如增溶劑、等張劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑及防腐劑。

【0218】 在各個實施例中，組合物可經調配用於例如使用加壓可接受之噴射劑(諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮及類似物)進行吸入。

【0219】 在各個實施例中，組合物亦可諸如使用可生物降解或不可生物降解之聚合物調配至持續釋放微膠囊中。非限制性示例性可生物降解調配物包括聚乳酸-乙醇酸(PLGA)聚合物。非限制性示例性不可生物降解調配物包括聚甘油脂肪酸酯。製備此類調配物之某些方法描述於例如EP 1125584 Al中。

【0220】 亦提供包括一或多個容器之醫藥劑量包裝，其各自含有一或多個劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在一些實施例中，提供單位劑量，其中單位劑量含有預定量之包含本發明抗CXCR5單株抗體之組合物且具有或不具有一或多種其他劑。在一些實施例中，此類單位劑量供應於用於注射之一次性預填充注射器中。在各個實施例中，單位劑量中所含之組合物可包含鹽水、蔗糖或類似物；緩衝液，諸如磷酸鹽或類似物；及/或在穩定且有效之pH值範圍內調配。或者，在一些實施例中，組合物可以凍乾粉末之形式提供，該凍乾粉末可在添

加適當液體(例如無菌水)後復原。在一些實施例中，組合物包含抑制蛋白質聚集之一或多種物質，包括但不限於蔗糖及精胺酸。在一些實施例中，本發明之組合物包含肝素及/或蛋白聚醣。

【0221】 醫藥組合物以有效治療或預防特定適應症之量投與。治療有效量典型地取決於所治療之個體的體重、其身體或健康狀況、所要治療之疾患的程度或所治療之個體的年齡。

【0222】 在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約50 μg至每公斤體重約50 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約100 μg至每公斤體重約50 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約100 μg至每公斤體重約20 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量每公斤體重約0.5 mg至每公斤體重約20 mg範圍內之量投與。

【0223】 在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約10 mg至約1,000 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約20 mg至約500 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約20 mg至約300 mg範圍內之量投與。在一些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體可以在每一劑量約20 mg至約200 mg範圍內之量投與。

【0224】 本發明抗CXCR5單株抗體組合物可按需要向個體投與。在一些實施例中，向個體投與一或多次有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在各個實施例中，每月一次、不到每月一次(諸如每兩個月、每三個月或每六個月一次)向個體投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在其他實施例中，超過一個月一次(諸如每兩週一次、每週一次、每週兩次、每週三次、每天一次或每天多

次)投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。至少一次向個體投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體。在一些實施例中，可多次投與有效劑量之本發明抗CXCR5單株抗體，包括持續至少一個月、至少六個月或至少一年之時間。在一些實施例中，按需要向個體投與本發明抗CXCR5單株抗體以緩解疾患之一或多種症狀。

5. 組合療法

【0225】 本發明之本發明抗CXCR5單株抗體，包括其功能片段，可與用於治療疾病之其他生物活性物質或其他治療程序組合向有需要之個體投與。舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可單獨或與其他治療模式一起投與。其可在其他治療模式(諸如放射療法)之前、實質上與其同時或在其之後提供。

【0226】 為治療癌症，本發明抗CXCR5單株抗體可結合抗癌劑中之一或多者(諸如免疫檢查點抑制劑、化學治療劑、生長抑制劑、抗血管生成劑或抗贅生組合物)進行投與。

【0227】 在某些實施例中，特異性結合於CXCR5之本發明抗CXCR5單株抗體(「CXCR5結合拮抗劑」) (例如CXCR5拮抗劑抗體)或其抗原結合片段與第二拮抗劑(諸如免疫檢查點抑制劑，例如PD-1或PD-L1路徑之抑制劑)一起向患有其中刺激免疫系統將有益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體投與。例如如下文關於本發明抗CXCR5單株抗體與免疫腫瘤劑之組合所描述，兩種拮抗劑可同時或連續投與。可將一或多種其他治療劑(例如檢查點調節劑)添加至使用本發明抗CXCR5單株抗體來治療癌症或自體免疫疾病之治療中。

【0228】 在某些實施例中，本發明抗CXCR5單株抗體與另一治療一起同時或連續地向個體(例如患有癌症之個體)投與。舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可與以下中之一或多者一起投與：放射療法、手術或化學療法，例如靶向化學療法或免疫療法。

【0229】 在某些實施例中，一種治療患有癌症之個體之方法包括向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及一或多種免疫腫瘤劑，諸如免疫檢查點抑制劑。

【0230】 免疫療法(例如使用免疫腫瘤劑之療法)有效增強、刺激及/或上調個體中之免疫反應。在一個態樣中，將本發明抗CXCR5單株抗體與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)一起投與在癌症之治療中(例如在抑制腫瘤生長中)具有協同效應。

【0231】 在一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體在投與免疫腫瘤劑之前依序投與。在一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)同時投與。在又一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體在投與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)之後依序投與。可相隔例如30分鐘、60分鐘、90分鐘、120分鐘、3小時、6小時、12小時、24小時、36小時、48小時、3天、5天、7天或一或多週之時開始兩種劑之投與，或可在已投與第一劑之後例如30分鐘、60分鐘、90分鐘、120分鐘、3小時、6小時、12小時、24小時、36小時、48小時、3天、5天、7天或一或多週之時開始投與第二劑。

【0232】 在某些態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑(例如PD-1抑制劑)為同時向患者投與，例如同時輸注，例如歷時30或60分鐘之時間。本發明抗CXCR5單株抗體可與免疫腫瘤劑(諸如PD-1抑制劑)共調配。

【0233】 免疫腫瘤劑包括例如小分子藥物、抗體或其片段或其他生物劑或小分子。生物免疫腫瘤劑之實例包括但不限於抗體、抗體片段、疫苗及細胞因子。在一個態樣中，抗體為單株抗體。在某些態樣中，單株抗體為人類化抗體或人類抗體。

【0234】 在一個態樣中，免疫腫瘤劑為(i)刺激(包括共刺激)分子(例如受體或配位體)之促效劑或者(ii)免疫細胞(例如T細胞)上之抑制(包括共抑制)分子(例如受體或配位體)之拮抗劑，此兩者使得放大抗原特異性T細胞反應。在某些態樣

中，免疫腫瘤劑為(i)刺激(包括共刺激)分子(例如受體或配位體)之促效劑或者(ii)參與先天免疫之細胞(例如NK細胞)上之抑制(包括共抑制)分子(例如受體或配位體)之拮抗劑，且其中免疫腫瘤劑增強先天免疫。此類免疫腫瘤劑常常稱為免疫檢查點調控因子，例如免疫檢查點抑制劑或免疫檢查點刺激劑。

【0235】 在某些實施例中，免疫腫瘤劑可為靶向(或特異性結合於)膜結合配位體之B7家族之成員的藥劑，膜結合配位體之B7家族包括B7-1、B7-2、B7-H1 (PD-L1)、B7-DC (PD-L2)、B7-H2 (ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5及B7-H6；或特異性結合於B7家族成員之共刺激或共抑制受體。免疫腫瘤劑可為靶向膜結合配位體之TNF家族之成員的藥劑或與其特定性結合之共刺激或共抑制受體，例如TNF受體家族成員。可由免疫腫瘤劑靶向之示例性TNF及TNFR家族成員包括CD40及CD40L、OX-40、OX-40L、GITR、GITRL、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137 (4-1BB)、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fnl4、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LTfiR、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素α/TNPβ、CXCR5、TNFa、LTfiR、淋巴毒素a 1β2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY及NGFR。可與本發明抗CXCR5單株抗體組合使用以便治療癌症之免疫腫瘤劑可為例如以下藥劑：靶向B7家族成員之抗體、B7受體家族成員、TNF家族成員或TNFR家族成員，諸如上文所描述之彼等物質。

【0236】 在一個態樣中，本發明抗CXCR5單株抗體與以下中之一或多者一起投與：(i)抑制T細胞活化之蛋白質(例如免疫檢查點抑制劑) (諸如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM3、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、

GARP、PDIH、LAIR1、TIM-1、TIM-4及PSGL-1)的拮抗劑；及(ii)刺激T細胞活化之蛋白質(諸如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB (CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、CD40L、DR3及CD28H)的促效劑。

【0237】 在一個態樣中，免疫腫瘤劑為對抑制T細胞活化之細胞因子(例如IL-6、IL-10、TGF-β、VEGF及其他免疫抑制細胞因子)進行抑制的藥劑(亦即，其拮抗劑)或為刺激T細胞活化且刺激免疫反應之細胞因子(諸如IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21及IFNα)之促效劑(例如細胞因子本身)。

【0238】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合用於刺激免疫系統(例如用於治療癌症及感染性疾病)之其他藥劑包括NK細胞上之抑制受體之拮抗劑或NK細胞上之活化受體之促效劑。舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可與KIR之拮抗劑組合。

【0239】 用於組合療法之其他藥劑包括抑制或消耗巨噬細胞或單核細胞之藥劑，包括但不限於CSF-IR拮抗劑，諸如CSF-IR拮抗劑抗體，包括RG7155 (WO11/70024、WO11/107553、WO11/131407、WO13/87699、WO13/119716、WO13/132044)或FPA008 (WO11/140249；WO13169264；WO14/036357)。

【0240】 免疫腫瘤劑亦包括抑制TGF-β信號傳導之藥劑。

【0241】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合之其他藥劑包括增強腫瘤抗原呈遞之藥劑，例如樹突細胞疫苗、GM-CSF分泌細胞疫苗、CpG寡核苷酸及咪喹莫特(imiquimod)，或增強腫瘤細胞之免疫原性的療法(例如蒽環類)。

【0242】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合之其他療法包括消耗或阻斷T_{reg}細胞之療法，例如特異性結合於CD25之藥劑。

【0243】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合之另一療法為抑制代謝酶(諸如吲哚胺加雙氧酶(IDO)、加雙氧酶、精胺酸酶或氧化氮合成酶)之療法。

【0244】 可使用之另一類別之藥劑包括抑制腺苷形成或抑制腺苷A2A受體之藥劑。

【0245】 可與本發明抗CXCR5單株抗體組合用於治療癌症之其他療法包括逆轉/阻止T細胞無力或耗竭之療法及觸發腫瘤位點處之先天免疫活化及/或炎症之療法。

【0246】 本發明抗CXCR5單株抗體可與超過一種免疫腫瘤劑(諸如免疫檢查點抑制劑)組合，且可例如與靶向多個免疫路徑元件之組合方法組合，該組合方法為諸如以下中之一者或多者：增強腫瘤抗原呈遞之療法(例如樹突細胞疫苗、GM-CSF分泌細胞疫苗、CpG寡核苷酸、咪喹莫特)；抑制負向免疫調控之療法，例如藉由抑制CTLA-4及/或PD1/PD-L1/PD-L2路徑及/或消耗或阻斷Treg或其他免疫抑制細胞；刺激正向免疫調控之療法，例如使用刺激CD-137、OX-40及/或GITR路徑及/或刺激T細胞效應功能之促效劑；系統性地增加抗腫瘤T細胞之頻率之療法；例如使用CD25之拮抗劑(例如達利珠單抗(daclizumab))或藉由離體抗CD25珠粒消耗消耗或抑制Treg (諸如腫瘤中之Treg)之療法；影響腫瘤中抑制骨髓細胞之功能的療法；增強腫瘤細胞之免疫原性之療法(例如蒽環類)；包括基因修飾之細胞(例如由嵌合抗原受體修飾之細胞)的過繼性T細胞或NK細胞轉移(CAR-T療法)；抑制代謝酶(諸如吲哚胺加雙氧酶(IDO)、加雙氧酶、精胺酸酶或氧化氮合成酶)之療法；逆轉/阻止T細胞無力或耗竭之療法；觸發腫瘤位點處之先天免疫活化及/或炎症之療法；投與免疫刺激細胞因子或阻斷免疫抑制細胞因子。

【0247】 舉例而言，本發明抗CXCR5單株抗體可與以下物質一起使用：連結正向共刺激受體之一或多種激動劑；通過抑制受體減弱信號傳導之一或多種拮抗劑(阻斷劑)，諸如克服腫瘤微環境內之獨特免疫抑制路徑(例如阻斷PD-L1/PD-1/PD-L2相互作用)之拮抗劑；系統性地增加抗腫瘤免疫細胞(諸如T細胞)

之頻率、消耗或抑制Treg (例如藉由抑制CD25)之一或多種藥劑；抑制代謝酶(諸如IDO)之一或多種藥劑；逆轉/阻止T細胞無力或耗竭之一或多種藥劑；及觸發腫瘤位點處之先天免疫活化及/或炎症之一或多種藥劑。

【0248】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為CTLA-4拮抗劑，諸如拮抗性CTLA-4抗體。合適之CTLA-4抗體包括例如YERVOY (伊匹單抗)或曲美木單抗(tremelimumab)。

【0249】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為PD-1拮抗劑，諸如拮抗性PD-1抗體。合適之PD-1抗體包括例如OPDIVO (納武單抗(nivolumab))、KEYTRUDA (派姆單抗(pembrolizumab))或MEDI-0680 (AMP-514；WO2012/145493)。免疫腫瘤劑亦可包括皮地利珠單抗(pidilizumab) (CT-011)。用於靶向PD-1受體之另一方法為由PD-L2之細胞外結構域(B7-DC)融合至IgGl之Fc部分組成之重組蛋白，稱為AMP-224。

【0250】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為PD-L1拮抗劑，諸如拮抗性PD-Ll抗體。合適之PD-L1抗體包括例如MPDL3280A (RG7446；WO2010/077634)、德瓦魯單抗(durvalumab) (MEDI4736)、BMS-936559 (WO2007/005874)、MSB0010718C (WO2013/79174)或rHigM12B7。

【0251】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為LAG-3拮抗劑，諸如拮抗性LAG-3抗體。合適之

LAG3抗體包括例如BMS-986016 (WO10/19570、WO14/08218)或IMP-731或IMP-321 (WO08/132601、WO09/44273)。

【0252】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為CD137 (4-1BB)促效劑，諸如促效性CD137抗體。合適之CD137抗體包括例如烏瑞魯單抗(urelumab)或PF-05082566 (W012/32433)。

【0253】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為GITR促效劑，諸如促效性GITR抗體。合適之GITR抗體包括例如TRX-518 (WO06/105021、WO09/009116)、MK-4166 (WO 11/028683)或WO2015/031667中揭示之GITR抗體。

【0254】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為OX40促效劑，諸如促效性OX40抗體。合適之OX40抗體包括例如MEDI-6383、MEDI-6469或MOXR0916 (RG7888；WO06/029879)。

【0255】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為CD40促效劑，諸如促效性CD40抗體。在某些實施例中，免疫腫瘤劑為CD40拮抗劑，諸如拮抗性CD40抗體。合適之CD40抗體包括例如魯卡妥木單抗(lucatumumab) (HCD122)、達西珠單抗(dacetuzumab) (SGN-40)、CP-870,893或Chi Lob 7/4。

【0256】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)

之個體，其中免疫腫瘤劑為CD27促效劑，諸如促效性CD27抗體。合適之CD27抗體包括例如萬利魯單抗(varlilumab) (CDX-1127)。

【0257】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為MGA271 (針對B7H3) (WOl 1/109400)。

【0258】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為KIR拮抗劑，諸如利麗單抗(lirilumab)。

【0259】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為IDO拮抗劑。合適之IDO拮抗劑包括例如INCB-024360 (WO2006/122150、WO07/75598、WO08/36653、WO08/36642)、吲哚莫德(indoximod)、NLG-919 (WO09/73620、WO09/1156652、WOl 1/56652、WO 12/142237)或F001287。

【0260】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為鐘樣受體促效劑，例如TLR2/4促效劑(例如卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin))；TLR7促效劑(例如喜通諾(Hiltonol)或咪喹莫特(Imiquimod))；TLR7/8促效劑(例如瑞喹莫特(Resiquimod))；或TLR9促效劑(例如CpG7909)。

【0261】 在一個實施例中，藉由向個體投與本發明之抗CXCR5單株抗體及免疫腫瘤劑來治療患有可因刺激免疫系統而受益之疾病(例如癌症或感染性疾病)之個體，其中免疫腫瘤劑為TGF-β抑制劑，例如GC1008、LY2157299、TEW7197或IMC-TR1。

6. 示例性抗CXCR5單株抗體

【0262】 本文所描述之發明提供對CXCR5具特異性之單株抗體，或其抗原結合片段。

【0263】 因此，本發明之一個態樣提供一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其與本文所描述之分離之單株抗體或其抗原結合片段中之任一者競爭結合至hCXCR5，或結合至由HFB2-4或其Hz變異體結合之抗原決定基。

【0264】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段為人類-小鼠嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、CDR接枝抗體或表面重修抗體。

【0265】 在一些實施例中，其抗原結合片段為Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【0266】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有增強ADCC之經工程改造之Fc區，諸如本文/上文所描述之彼等，包括雙重突變hG1DE。

【0267】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5具特異性，例如實質上不與CXCR3交叉反應，及/或實質上不與小鼠或食蟹猴CXCR5交叉反應。

【0268】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段對hCXCR5具有≤1 μM、≤100 nM、≤50 nM、≤25 nM、≤20 nM、≤15 nM、≤10 nM、≤5 nM、≤2 nM、≤1 nM、≤0.1 nM、≤0.01 nM或≤0.001 nM (例如10^{-8} M或更小，例如10^{-8} M至10^{-13} M，例如10^{-9} M至10^{-13} M)之解離常數(K_d)。

【0269】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段結合至由HFB2-4或其Hz變異體(諸如Hz9、Hz12、Hz14、Hz15、Hz37、Hz38、Hz39、

Hz40、Hz41及Hz42)結合之抗原決定基。

【0270】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段以EC50為約0.4至4 nM (諸如約0.9 nM或約1.2 nM)之表觀親和力結合細胞上所表現之hCXCR5。

【0271】 在某些實施例中，在cAMP報告子分析中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段以約0.5至3.5 nM (諸如約0.49 nM)之EC50拮抗CXCR5-CXCL13信號傳導。

【0272】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段針對表現hCXCR5之細胞展現EC50小於0.1 nM (例如0.001至0.1 nM，諸如約0.002 nM)之ADCC活性。

【0273】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段介導NK細胞以小於0.1 fM.或約0.3 aM至0.8 pM之EC50殺死表現hCXCR5之人類B細胞。

【0274】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段結合hCXCR5，但並不可偵測地結合人類趨化因子受體CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CMKLR1、CXCR3R1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CXCR7及XCR1。

【0275】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段消耗外周血中之B細胞，視情況可逆地消耗外周血中之B細胞。

【0276】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段消耗外周血及/或脾臟中之Tfh樣細胞。

【0277】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段抑制CXCR5結合至CXCL13。

【0278】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段抑制CXCL13對細胞中以其他方式由佛司可林(forskolin)觸發而產生cAMP之抑制作

用，從而使得cAMP水準與不存在抗體或其抗原結合片段情況下之cAMP水準相比有所增加(例如以約0.4至3.5 nM (諸如約0.49 nM)之EC50抑制CXCL13對產生cAMP之抑制作用)。視情況，對CXCL13抑制之最大抑制為至少約60%、70%或80%。

【0279】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段在人類供體外周血單核細胞(PBMC)中觸發表現CXCR5之細胞之ADCC。

【0280】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合hCXCR5且與本發明之抗體或其抗原結合片段中之任一者競爭。

表A：示例性抗人類CXCR5抗體之CDR、構架(FR)、可變重鏈及可變輕鏈

抗體		序列	SEQ ID NO:
HFB2-1	VH CDR1	GFTFSNYW	1
	VH CDR2	IRLKSDNYAT	2
	VH CDR3	TPPNFDY	3
	VH FR1	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS	4
	VH FR2	MNWVRQSPEKGLEWVAQ	5
	VH FR3	HYTESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYC	6
	VH FR4	WGQGTTLTVSS	7
	VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRLKSDNYATHYTESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTPPNFDYWGQGTTLTVSS	8
	VL CDR1	TSLLHRSGKHK	9
	VL CDR2	YVS	10
	VL CDR3	MQSLEFPLT	11
	VL FR1	DIVMTQAAPSVTVTPGESVTISCRST	12
	VL FR2	FYWFLQRPGQSPQLLIY	13
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDFGVYYC	14
	VL FR4	FGTGTKLEIK	15
	VL	DIVMTQAAPSVTVTPGESVTISCRSTTSLLHRSGKHKFYWFLQRPGQSPQLLIYYVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDFGVYYCMQSLEFPLTFGTGTKLEIK	16
HFB2-2	VH CDR1	GFTFNTNA	17
	VH CDR2	IRSKSNNYAT	18
	VH CDR3	VSWDPFAY	19
	VH FR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20
	VH FR2	MNWVRQAPGKGLEWVAR	21
	VH FR3	HYVDSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYC	22

	VH FR4	WGQGTLVTVSA	23
	VH	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATHYVDSVKDRFTIS RDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVSWDPFAYWG QGTLVTVSA	24
	VL CDR1	QSVLYSSNQKNY	25
	VL CDR2	WAS	26
	VL CDR3	HQYLSSWT	27
	VL FR1	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	28
	VL FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	29
	VL FR3	TRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQTEDLAVYYC	30
	VL FR4	FGGGAKLEIK	31
	VL	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKN YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRASGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQTEDLAVYYCHQYLSSWTFGGGAKLEIK	32
HFB2-3	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	TWSGGRT	34
	VH CDR3	ARGGNY	35
	VH FR1	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVS	36
	VH FR2	VHWVRQSPGKGLEWLGV	37
	VH FR3	DYNAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVNDTAIYYC	38
	VH FR4	WGQGTSVTVSS	39
	VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVR QSPGKGLEWLGVTWSGGRTDYNAAFISRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQVNDTAIYYCARGGNYWGQGTSVTVSS	40
	VL CDR1	ESVDNYGISF	41
	VL CDR2	AAS	42
	VL CDR3	QQSKEVPWT	43
	VL FR1	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRAS	44
	VL FR2	MNWFQQKPGQPPKLLIY	45
	VL FR3	NQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC	46
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNW FQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDQVQ LKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPG KGLEWLGVIWGDGSTNYHSTLISRLSISKDNSKSQVFL KLNSLQTDDTATYYCARVAYWGQGTLVTVSAFSLNIH PMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK	48
HFB2-4	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS	52
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWLGV	53
	VH FR3	NYHSGLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATYYC	54
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	55
	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVR QPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLSISKDNSKS QVFLKLNSLQSDDTATYYCARVVYWGQGTLVTVSA	56
	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57

	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISCRSS	60
	VL FR2	LYWFLQRPGQSPQLLLY	61
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC	62
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISCRSSKSLLHSNGKTYLY WFLQRPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFT LRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK	63
HFB2-5	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVAY	65
	VH FR1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS	52
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWLGV	53
	VH FR3	NYHSTLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQTDDTATYYC	64
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	55
	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVR QPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSTLISRLSISKDNSKS QVFLKLNSLQTDDTATYYCARVAYWGQGTLVTVSA	165
	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSS	66
	VL FR2	LYWFLQRPGQSPQLLIY	67
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC	62
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGKTYLY WFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFT LRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK	68
HFB2-6	VH CDR1	GYTFTDYT	69
	VH CDR2	IYPGSGNI	70
	VH CDR3	ARGLRREFAY	71
	VH FR1	QIQLQQSGPELVEPGASVKLSCKAS	72
	VH FR2	IHWVKQSPGQGLEWIGW	73
	VH FR3	KYNDKFKGKATMTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	74
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	55
	VH	QIQLQQSGPELVEPGASVKLSCKASGYTFTDYTIHWVK QSPGQGLEWIGWIYPGSGNIKYNDKFKGKATMTADKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGLRREFAYWGQGTL VTVSA	75
	VL CDR1	KSLLHSNGITY	76
	VL CDR2	QMS	77
	VL CDR3	AQSLELPLT	78
	VL FR1	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS	79
	VL FR2	LYWYLQKPGQSPQLLIY	80
	VL FR3	NLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYC	81
	VL FR4	FGAGTKLELK	82

	VL	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFT LRISRVEAEDVGVYYCAQSLELPLTFGAGTKLELK	83

【0281】 在一些實施例中，本發明之抗人類CXCR5抗體或其抗原結合片段包含表A及表B中所列之任一抗體的至少一個、兩個或三個(例如所有三個)對應VH CDR。

【0282】 在一些實施例中，本發明之抗人類CXCR5抗體或其抗原結合片段包含表A及表C中所列之任一抗體的至少一個、兩個或三個(例如所有三個)對應VL CDR。

【0283】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 1、2及3之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 9、10及11之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0284】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 17、18及19之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 25、26及27之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0285】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、34及35之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 41、42及43之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0286】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0287】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、49及65之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0288】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 69、70及71之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 76、77及78之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0289】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 149、150及151之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0290】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含分別包含SEQ ID NO: 114、115及116之胺基酸序列的VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列，及分別包含SEQ ID NO: 120、121及122之胺基酸序列的VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【0291】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段在本發明之抗體之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3中之任何一或多者中包含至多1、2、3、4或5 (例如至多1、2或3)個胺基酸殘基改變(例如缺失、插入或取代(例如保守取代))；及/或在本發明之抗體之VL CDR1、VH CDR2及VH CDR3中之任何一或多者中包含1、2、3、4或5 (例如至多1、2或3)個胺基酸殘基改變(例如缺失、插入或取代(例如保守取代))。

【0292】 根據本發明之抗人類CXCR5抗體或其抗原結合片段可使用如表A中所描述之胺基酸序列之構架區(FR)中之任一者，或與如表A中所描述之FR胺基

酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列來製備。在某些實施例中，重鏈FR區全部來自本文之相同例示抗體。在某些實施例中，輕鏈FR區全部來自本文之相同例示抗體。在某些實施例中，重鏈與輕鏈FR區均全部來自本文之相同例示抗體。

【0293】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含表A中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VH FR1)、重鏈構架區2 (VH FR2)、重鏈構架區3 (VH FR3)及/或重鏈構架區4 (VH FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VH FR1、VH FR2、VH FR3及/或VH FR4包含與如表A中所描述之任一抗體之對應VH FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0294】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 4、20、36、52或72之VH FR1，或與SEQ ID NO: 4、20、36、52或72實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0295】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 5、21、37、53或73之VH FR2，或與SEQ ID NO: SEQ ID NO: 5、21、37、53或73實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0296】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 6、22、38、54、64或74之VH FR3，或與SEQ ID NO: 6、22、38、54、64或74實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0297】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID

NO: 7、23、39或55之VH FR4，或與SEQ ID NO: 7、23、39或55實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0298】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含表A中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VL FR1)、重鏈構架區2 (VL FR2)、重鏈構架區3 (VL FR3)及/或重鏈構架區4 (VL FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VL FR1、VL FR2、VL FR3及/或VL FR4包含與如表A中所描述之任一抗體之對應VL FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0299】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 12、28、44、60、66或79之VL FR1，或與SEQ ID NO: 12、28、44、60、66或79實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0300】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 13、29、45、61、67或80之VL FR2，或與SEQ ID NO: 13、29、45、61、67或80實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0301】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14、30、46、62或81之VL FR3，或與SEQ ID NO: 14、30、46、62或81實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0302】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 15、31、47或82之VL FR4，或與SEQ ID NO: 15、31、47或82實質上一致

(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之胺基酸序列。

【0303】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL構架序列及VH構架序列，且其中VL構架序列或VH構架序列之一者或兩者與衍生出它們之人類生殖系序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致，且其中衍生出VL構架序列之人類生殖系VL序列選自由以下組成之群：V1-22、Vλ共同序列、Vλ1共同序列、Vλ3共同序列、Vκ共同序列、Vκ1共同序列、Vκ2共同序列及Vκ3，且其中衍生出VH構架序列之人類生殖系VH序列選自由以下組成之群：VH3、VH5、VH1及VH4。

【0304】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL構架序列及VH構架序列，且其中VL構架序列及/或VH構架序列中之一者或兩者與衍生出它們之人類生殖系序列至少66%、76%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

【0305】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL構架序列及VH構架序列，且其中VL構架序列或VH構架序列中之一者或兩者與衍生出它們之人類生殖系序列相同。

【0306】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的。

【0307】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段展現增強之ADCC。

【0308】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含衍生自人類VH3生殖系序列之構架VH序列。

【0309】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含Fc結構域，諸如IgA (例如IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgM或IgG (例如IgG1、IgG2、

IgG3或IgG4)之Fc結構域。在某些實施例中，Fc結構域為IgG之Fc結構域，諸如(人類) IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之Fc結構域。

【0310】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段，其中抗體或抗原結合片段為Fc融合蛋白、單抗體(monobody)、大抗體(maxibody)、雙官能抗體、scFab、scFv、肽體。

【0311】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段以約為或小於選自由以下組成之群的值的K_D結合人類CXCR5：約10nM、5nM、2nM、1nM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、250pM、200pM、150pM、100pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、5pM及1pM。

【0312】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段在人類中具有約一(1)天至七(7)天之預測半衰期。

【0313】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段(包括人類化單株抗體或其抗原結合片段)具有良好可開發性型態，包括在高溫(例如25°C或40°C)、低pH值條件(例如pH3.5約室溫)下及/或在若干輪冷凍/解凍循環之後為穩定的。

【0314】 在某些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段(包括人類化單株抗體或其抗原結合片段)在胺基酸序列中包括經設計以改良抗體之可開發性的一或多個點突變。舉例而言，Raybould等人(Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling, *PNAS* 116(10): 4025-4030, 2019)描述了治療性抗體分析器(TAP)，其為構建可變結構域序列之可下載同源模型、針對五條可開發性準則對其進行測試且報告潛在序列傾向及典型形式的計算工具。作者進一步使TAP在opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/TAP.php可自由獲得。

【0315】 除實現對抗原之所需親和力外，治療性mAb開發仍存在許多障壁。此等障壁包括固有免疫原性、化學及構象不穩定性、自我締合、高黏度、多特異性及不良表現。舉例而言，特定而言在高度可變之互補決定區(CDR)中之高疏水性水準重複地與聚集、黏度及多特異性有關。重鏈及輕鏈可變結構域之淨電荷的不對稱性亦與高濃度下之自我締合及黏度相關。CDR中之正電荷及負電荷之補丁(patch)與高清除率及不良表現水準有關。產物異質性(例如通過氧化、異構化或糖基化)常常由容易發生轉譯後或轉譯時修飾之特定序列基元引起。計算工具可用於促進序列傾向之鑑定。Warszawski等人(Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces. *PLoS Comput Biol* 15(8): e1007207. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007207)亦描述了藉由可變輕-重鏈界面之自動化設計來優化抗體親和力及穩定性之方法。可獲得用於鑑定候選抗體之潛在可開發性問題之其他方法，且在本發明之較佳實施例中，可經由習知方法向候選抗體引入一或多個點突變以解決此類問題，從而產生優化之本發明之治療抗體。

7. 人類化抗體

【0316】 在一些實施例中，本發明之抗體為人類化抗體。人類化抗體適合作為治療劑分子，因為人類化抗體降低或消除人類對非人類抗體之免疫反應(諸如人類抗小鼠抗體(HAMA)反應)，人類對非人類抗體之免疫反應可產生對抗體治療劑之免疫反應，且降低治療劑之有效性。

【0317】 抗體可藉由任何標準方法來進行人類化。人類化之非限制性示例性方法包括描述於例如美國專利第5,530,101號；第5,585,089號；第5,693,761號；第5,693,762號；第6,180,370號；Jones等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann等人, Nature 332: 323-27 (1988)；Verhoeyen等人, Science 239: 1534-36

(1988)；及美國公開案第US 2009/0136500號中之方法。所有參考文獻均以引用之方式併入本文中。

【0318】 人類化抗體為其中非人類可變區之構架區中至少一個胺基酸已經來自人類構架區中對應位置之胺基酸置換的抗體。在一些實施例中，非人類可變區之構架區中至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少10個、至少11個、至少12個、至少15個或至少20個胺基酸經來自一或多個人類構架區中之一或多個對應位置之胺基酸置換。

【0319】 在一些實施例中，用於取代之對應人類胺基酸中之一些來自不同人類免疫球蛋白基因之構架區。換句話說，在一些此類實施例中，非人類胺基酸中之一或多者可經來自第一人類抗體之人類構架區之對應胺基酸置換或由第一人類免疫球蛋白基因編碼，非人類胺基酸中之一或多者可經來自第二人類抗體之人類構架區之對應胺基酸置換或由第二人類免疫球蛋白基因編碼，非人類胺基酸中之一或多者可經來自第三人類抗體之人類構架區之對應胺基酸置換或由第三人類免疫球蛋白基因編碼，等等。另外，在一些實施例中，單個構架區(例如FR2)中用於取代之所有對應人類胺基酸不需要來自相同人類構架。然而，在一些實施例中，用於取代之所有對應人類胺基酸來自相同人類抗體或由相同人類免疫球蛋白基因編碼。

【0320】 在一些實施例中，藉由將一或多個整個構架區用對應人類構架區置換來對抗體進行人類化。在一些實施例中，選擇與所置換之非人類構架區具有最高同源性水準之人類構架區。在一些實施例中，此類人類化抗體為CDR接枝抗體。

【0321】 在一些實施例中，在CDR接枝之後，一或多個構架胺基酸變回小鼠構架區中之對應胺基酸。在一些實施例中，進行此類「反突變」以保留似乎有助於CDR中之一或多者之結構及/或可參與抗原接觸及/或似乎與抗體之總結構

完整性有關之一或多個小鼠構架胺基酸。在一些實施例中，在CDR接枝之後對抗體之構架區進行十處或更少、九處或更少、八處或更少、七處或更少、六處或更少、五處或更少、四處或更少、三處或更少、兩處或更少、一處或零處反突變。

表B：衍生自HFB2-4之示例性人類化VH序列

VH序列		序列	SEQ ID NO:
HFB2-4hz-VH1	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	84
	VH FR2	VSWVRQAPGQGLEWMGV	85
	VH FR3	NYAQKFQGRVTITKDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	86
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKFQGRVTITKDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	88
HFB2-4hz-VH2	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	89
	VH FR2	VSWVRQAPGKGLEWVGV	90
	VH FR3	NYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYC	91
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWVGVIWGDGSTNYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	92
HFB2-4hz-VH3	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	93
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWIGV	94
	VH FR3	NYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC	95
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	96
HFB2-4hz-VH6	VH CDR1	GFSLTSYG	33

	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS	138
	VH FR2	VSWVRQPPGKGLEWIGV	94
	VH FR3	NYNPSLKSRLTISKDKSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC	139
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRLTISKDKSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	140
HFB2-4hz-VH8	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVS	141
	VH FR2	VSWVRQAPGKGLEWLGV	142
	VH FR3	NYHSGLISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC	143
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	144
HFB2-4hz-VH10	VH CDR1	GFSLTSYG	33
	VH CDR2	IWGDGST	49
	VH CDR3	ARVVY	51
	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	132
	VH FR2	VSWVRQAPGQGLEWMGV	85
	VH FR3	NYAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC	110
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS	113

表C：衍生自HFB2-4之示例性人類化VL序列

VL序列		序列	SEQ ID NO:
HFB2-4hz-VL1	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS	97
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLIY	98
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	99
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGS	101

		GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK	
HFB2-4hz-VL2	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS	97
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLLY	102
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC	99
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKT YLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK	137
HFB2-4hz-VL3	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSS	103
	VL FR2	LYWFQQKPGKAPKLLLY	104
	VL FR3	NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYY C	105
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGKAPKLLLYRMSNLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCMQHLEYPYT FGGGTKVEIK	106
HFB2-4hz-VL4	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSS	103
	VL FR2	LYWFQQKPGKAPKLLIY	107
	VL FR3	NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	108
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGKAPKLLIYRMSNLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCMQHLEYPYTFG GGTKVEIK	109
HFB2-4hz-VL6	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSS	50
	VL FR2	LYWFQQKPGQAPRLLIY	135
	VL FR3	NLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYY C	136
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSG SGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTF	112

		GQGTKLEIK	
HFB2-4hz-VL7	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSS	145
	VL FR2	LYWFQQKPGQSPKLLLY	146
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YC	147
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGQSPKLLLYRMSNLASGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCMQHLEYPYT FGQGTKLEIK	148
HFB2-4hz-VL1b	VL CDR1	QSLLHSNGYNY	149
	VL CDR2	RGS	150
	VL CDR3	MQHLQYPYT	151
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS	97
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLIY	98
	VL FR3	NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC	152
	VL FR4	FGGGTKVEIK	100
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGY NYLYWFLQKPGQSPQLLIYRGSNRASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLQYPYT FGGGTKVEIK	153
HFB2-4hz-VL1c	VL CDR1	KSLLHSNGKTY	57
	VL CDR2	RMS	58
	VL CDR3	MQHLEYPYT	59
	VL FR1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPISLSCRSS	154
	VL FR2	LYWFLQKPGQSPQLLLY	102
	VL FR3	NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC	99
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPISLSCRSSKSLLHSNGKT YLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKLEIK	155

表D：衍生自HFB2-4之示例性人類化抗體

抗體		**序列**	**SEQ ID NO:**
HFB2-4hG1 (親本)	VH CDR1	GFSLTSYGVS	114
	VH CDR2	VIWGDGSTN	115
	VH CDR3	VVY	116
	VH FR1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS	52
	VH FR2	WVRQPPGKGLEWLG	117
	VH FR3	YHSGLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATY YCAR	118
	VH FR4	WGQGTLVTVSA	119

	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLSI SKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATYYCARVVYWG QGTLVTVSA	56
	VL CDR1	RSSKSLLHSNGKTYLY	120
	VL CDR2	RMSNLAS	121
	VL CDR3	MQHLEYPYT	122
	VL FR1	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISC	123
	VL FR2	WFLQRPGQSPQLLL	124
	VL FR3	GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC	125
	VL FR4	FGGGTKLEIK	47
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESISISCRSSKSLLHSNGKT YLYWFLQRPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSG SGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKLEIK	63
HFB2-4hz37hG1	VH CDR1	GFSLTSYGVS	114
	VH CDR2	VIWGDGSTN	115
	VH CDR3	VVY	116
	VH FR1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	93
	VH FR2	WVRQPPGKGLEWIG	126
	VH FR3	YNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCAR	127
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH (VH3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVS WVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTI SKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS	96
	VL CDR1	RSSKSLLHSNGKTYLY	120
	VL CDR2	RMSNLAS	121
	VL CDR3	MQHLEYPYT	122
	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	128
	VL FR2	WFQQKPGQAPRLLIY	129
	VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYC	130
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL (VL6)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGK TYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSG SGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK	112
HFB2-4hz42hG1	VH CDR1	GFSLTSYGVS	114
	VH CDR2	VIWGDGSTN	115
	VH CDR3	VVY	116
	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	132
	VH FR2	WVRQAPGQGLEWMG	133
	VH FR3	YAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCAR	134
	VH FR4	WGQGTLVTVSS	87
	VH (VH10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLTSYG VSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKLQ GRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	113

		VVYWGQGTLVTVSS	
	VL CDR1	RSSKSLLHSNGKTYLY	120
	VL CDR2	RMSNLAS	121
	VL CDR3	MQHLEYPYT	122
	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	128
	VL FR2	WFQQKPGQAPRLLIY	129
	VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYC	130
	VL FR4	FGQGTKLEIK	131
	VL (VL6)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTFGQGTKLEIK	112

【0322】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含表B中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VH FR1)、重鏈構架區2 (VH FR2)、重鏈構架區3 (VH FR3)及/或重鏈構架區4 (VH FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VH FR1、VH FR2、VH FR3及/或VH FR4序列包含與如表B及表D中所描述之任一抗體之對應VH FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0323】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 84、85、86及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0324】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 89、90、91及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0325】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH

FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 93、94、95及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0326】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 138、94、139及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0327】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 141、142、143及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0328】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 132、85、110及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0329】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 93、126、127及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0330】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列，該VH FR1、VH FR2、VHFR3及VH FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 132、133、134及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0331】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段具有輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含表C中所列之任一抗體之對應重鏈構架區之重鏈構架區1 (VL FR1)、重鏈構架區2 (VL FR2)、重鏈構架區3 (VL FR3)及/或重鏈構架區4 (VL FR4)中之一者、兩者、三者或全部(亦即，四者)，或VL FR1、VL FR2、VL FR3及/或VL FR4包含與如表C及表D中所描述之任一抗體之對應VL FR胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)之序列。

【0332】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 97、98、99及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0333】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 97、102、99及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0334】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4

序列分別包含與SEQ ID NO: 103、104、105及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0335】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 103、107、108及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0336】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 50、135、136及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0337】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 128、129、130及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0338】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 145、146、147及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0339】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL

FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 97、98、152及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【0340】 在一些實施例中，本發明之單株抗體或其抗原結合片段包含VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列，該VL FR1、VL FR2、VLFR3及VL FR4序列分別包含與SEQ ID NO: 154、102、99及47之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

表E：衍生自HFB2-4之所選人類化抗體

抗體	VH	VL	VH序列	VL序列
HFB2-4hz2hG1	VH1	VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKFQGRVTITKDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 88)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 137)
HFB2-4hz5hG1	VH2	VL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWVGVIWGDGSTNYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 92)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 101)
HFB2-4hz6hG1	VH2	VL2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSYGVSWVRQAPGKGLEWVGVIWGDGSTNYAASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 92)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLLYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 137)
HFB2-4hz9hG1	VH3	VL1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGKTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 101)
HFB2-	VH3	VL2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASIS

4hz10hG1			CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCARVVYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	CRSSKSLLHSNGKTYLYWFL QKPGQSPQLLLYRMSNLASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 137)
HFB2-4hz11hG1	VH3	VL3	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGKAPKLLLYRMSNLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 106)
HFB2-4hz12hG1	VH3	VL4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGKAPKLLIYRMSNLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCMQHLEYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 109)
HFB2-4hz14hG1	VH3	VL1b	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSQSLLHSNGYNYLYWFL QKPGQSPQLLIYRGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQHLQYPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 153)
HFB2-4hz15hG1	VH3	VL1c	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPISLS CRSSKSLLHSNGKTYLYWFL QKPGQSPQLLLYRMSNLASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMQHLEYPYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 155)
HFB2-4hz37hG1	VH3	VL6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQAPRLLIYRMSNLAS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSV QSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)
HFB2-4hz38hG1	VH3	VL7	QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRVTISKDTSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQSPKLLLYRMSNLAS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCMQHLEYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 148)
HFB2-4hz39hG1	VH6	VL6	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLT CAVSGFSLTSYGVSWVRQPP GKGLEWIGVIWGDGSTNYNP SLKSRLTISKDKSKNQVSLKL	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQAPRLLIYRMSNLAS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSV

			SSVTAADTAVYYCARVVYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 140)	QSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)
HFB2-4hz41hG1	VH8	VL7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAVSGFSLTSYGVSWVRQA PGKGLEWLGVIWGDGSTNYH SGLISRLTISKDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVVY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 144)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQSPKLLLYRMSNLAS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCMQHLEYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 148)
HFB2-4hz42hG1	VH10	VL6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFSLTSYGVSWVRQA PGQGLEWMGVIWGDGSTNY AQKLQGRVTMTKDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARVV YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 113)	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRSSKSLLHSNGKTYLYWF QQKPGQAPRLLIYRMSNLAS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSV QSEDVAVYYCMQHLEYPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)

【0341】 在一些實施例中，人類化抗體亦包含人類重鏈恆定區及/或人類輕鏈恆定區。

8. 人類抗體

【0342】 在一些實施例中，本發明之抗體為人類抗體。人類抗體可藉由任何合適之方法來製備。非限制性示例性方法包括在包含人類免疫球蛋白基因座之基因轉殖小鼠中製備人類抗體。參見例如Jakobovits等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-55 (1993)；Jakobovits等人, Nature 362: 255-8 (1993)；onberg等人, Nature 368: 856-9 (1994)；及美國專利第5,545,807號；第6,713,610號；第6,673,986號；第6,162,963號；第5,545,807號；第6,300,129號；第6,255,458號；第5,877,397號；第5,874,299號；及第5,545,806號。

【0343】 非限制性示例性方法亦包括使用噬菌體展示文庫製備人類抗體。參見例如Hoogenboom等人, J. Mol. Biol. 227: 381-8 (1992)；Marks等人, J. Mol. Biol. 222: 581-97 (1991)；及PCT公開案第WO 99/10494號。

抗體恆定區

【0344】 在一些實施例中，本文所描述之人類化、嵌合或人類抗體包含一或多個人類恆定區。在一些實施例中，人類重鏈恆定區屬於選自IgA、IgG及IgD

之同型。在一些實施例中，人類輕鏈恆定區屬於選自κ及λ之同型。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG恆定區，例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些實施例中，抗體或Fc融合配偶體例如在IgG1恆定區中包含C237S突變。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG2重鏈恆定區。在一些此類實施例中，如美國專利第6,900,292號中所描述，IgG2恆定區包含P331S突變。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG4重鏈恆定區。在一些此類實施例中，本文所描述之抗體在人類IgG4恆定區中包含S241P突變。參見例如Angal等人Mol. Immunol. 30(1):105-108 (1993)。在一些實施例中，本文所描述之抗體包含人類IgG4恆定區及人類κ輕鏈。

【0345】 重鏈恆定區之選擇可決定抗體是否將在活體內具有效應功能。在一些實施例中，此類效應功能包括抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)，且可引起對與抗體結合之細胞之殺傷作用。典型地，包含人類IgG1或IgG3重鏈之抗體具有效應功能。

【0346】 在一些實施例中，效應功能為不需要的。舉例而言，在一些實施例中，在炎症病狀及/或自體免疫病症之治療中，效應功能可為不需要的。在一些此類實施例中，對人類IgG4或IgG2重鏈恆定區加以選擇或工程改造。在一些實施例中，IgG4恆定區包含S241P突變。

【0347】 本文所描述之抗體中之任一者可藉由任何合適之方法進行純化。此類方法包括但不限於使用親和力基質或疏水相互作用層析。合適之親和力配位體包括與抗體結合之抗原及/或抗原決定基，及結合抗體恆定區之配位體。舉例而言，蛋白質A、蛋白質G、蛋白質A/G或抗體親和管柱可用於結合恆定區及純化抗體。

【0348】 在一些實施例中，疏水性相互作用層析(HIC) (例如丁基或苯基管柱)亦用於純化一些多肽。許多純化多肽之方法為此項技術中已知的。

【0349】 或者，在一些實施例中，在無細胞系統中產生本文所描述之抗體。非限制性示例性無細胞系統描述於例如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)中。

9. 抗體海藻糖基化及非海藻糖基化

【0350】 本發明之一個態樣提供結合CXCR5之海藻糖基化及非海藻糖基化抗體及包含此類抗體之組合物以及此類抗體之用途，包括治療及醫藥用途。

【0351】 或者，本發明提供展現改變之效應功能的抗CXCR5抗體。在一些實施例中，改變之效應功能為增加之ADCC。在一些實施例中，抗體缺乏或含有可偵測地降低之水準(例如<10%、<5%、<2%)之海藻糖(亦即，其為非海藻糖基化的)。

【0352】 在一些實施例中，提供能夠形成結合CXCR5之抗體的非海藻糖基化抗體重鏈及輕鏈。在一些實施例中，提供包含一或多個特定互補決定區(CDR)之非海藻糖基化抗體、重鏈及輕鏈。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體具有改變之效應功能。在一些實施例中，相對於以其他方式相同之本發明之海藻糖基化抗CXCR5抗體，本發明之抗體具有增強之ADCC活性。

【0353】 L-海藻糖(或6-去氧-L-半乳糖)為一種單醣，其為動物中之一些N-鍵聯及O-鍵聯之聚醣及醣酯之組分(Becker及Lowe, *Glycobiology* 13:41R-51R, 2003，該參考文獻以引用之方式併入本文中)。典型地添加海藻糖作為對聚醣(包括連接至血型抗原、選擇素及抗體之聚醣)之末端修飾。海藻糖可藉由特定海藻糖基轉移酶經由α(1,2)-鍵聯、α(1,3)-鍵聯、α(1,4)-鍵聯及α(1,6)-鍵聯連接至聚醣。α(1,2)-海藻糖鍵聯典型地與H-血型抗原相關。α(1,3)-海藻糖鍵聯及α(1,4)-海藻糖鍵聯與LewisX抗原之修飾相關。α(1,6)-海藻糖鍵聯與N-鍵聯之GlcNAc分子相關，諸如抗體上之彼等N-鍵聯之GlcNAc分子。

【0354】 本發明之「非海藻糖基化」抗體包括缺乏海藻糖之抗體，例如在恆定區糖基化中缺乏海藻糖之IgG1或IgG3同型抗體。人類IgGl或IgG3之糖基化發生在Asn297處，因為核心海藻糖基化雙觸角複合物寡醣糖基化在達至2個Gal殘基之情況下終止。

【0355】 存在於IgG之CH2結構域中之複合物寡醣結構之主要類型或「醣型」描述於WO 99/22764 (以引用之方式併入本文中，參見第7頁)中。在此，G0係指其中不存在末端唾液酸(NeuAc)或Gal之雙觸角結構，G1係指具有一個Gal而沒有NeuAc之雙觸角結構，且G2係指具有兩個末端Gal而沒有NalAc之雙觸角結構。

【0356】 在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體在Asn297處缺乏海藻糖。此等結構視末端Gal殘基之量而定命名為G0、G1 (1,6或1,3)或G2聚醣殘基。參見例如Raju, BioProcess Int.1: 44-53 (2003)。抗體Fc之CHO型糖基化描述於例如Routier, Glycoconjugate J.14: 201-207 (1997)中。

【0357】 在一些實施例中，如本文中可互換使用之「非海藻糖基」或「非海藻糖基化」抗體係指已經糖工程改造從而缺乏核心海藻糖之抗體。在聚醣部分中具有降低之海藻糖含量之抗體對FcγRIIIa (CD16)具有增加之親和力，且因此，具有增強之活性依賴性細胞毒性(ADCC)活性。

【0358】 可使用POTELLIGENT® CHOK1SV細胞株(Lonza Biologics)產生非海藻糖基抗體，其缺乏負責海藻糖添加之基因(α1,6-海藻糖基轉移酶)的兩個等位基因。非海藻糖基或海藻糖減少之抗體亦可藉由以各種方式修改寡醣生物合成活性來產生。舉例而言，N-乙醯葡糖胺-轉移酶III (GnTIII)在製備細胞株之高爾基氏體中之過表現產生與抗體之Fc恆定區相關之二等分寡醣結構且抑制海藻糖基化。在此類表現系統中，GnTIII表現水準與非海藻糖基化IgG1醣型及所得增強之ADCC活性之產生有關。

【0359】 亦可藉由使用糖類似物(諸如但不限於如WO 2012/019165中所描述之海藻糖類似物)降低細胞培養物中之海藻糖基化。因此，可使用此項技術中熟知之多種方法產生非海藻糖基化或海藻糖減少之抗體。

【0360】 在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體對FcγRIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體對FcγRIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體對FcγRIIIA(F158)具有增強之親和力。

【0361】 「醣型」係指包含各種碳水化合物單元之鍵聯的複合物寡醣結構。此類結構描述於例如Essentials of Glycobiology Varki等編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999)中，該參考文獻亦提供標準糖生物學命名法之綜述。此類醣型包括但不限於G2、G1、G0、G-1及G-2 (參見例如國際專利公開案第WO 99/22764號)。

【0362】 「糖基化模式」定義為碳水化合物單元共價連接至蛋白質(例如醣型)以及醣型共價連接至蛋白質之肽骨架(更特定而言連接至免疫球蛋白)之位點的模式。

【0363】 在一些實施例中，在非糖修飾之CHO宿主細胞中重組表現之一批抗體中至少85%在Asn297處為海藻糖基化的。

【0364】 當提及包含複數個抗體之組合物時，若組合物中之抗體中不到約5%在至少一個Asn297處包含海藻糖，則將抗體視為非海藻糖基化的。

【0365】 在某些實施例中，非海藻糖基化之水準為約100%，換句話說，使用用於量測抗體之海藻糖基化的標準方法在任一重鏈Asn297醣型上均未偵測到海藻糖。

【0366】 量測海藻糖之方法包括此項技術中已知之任何方法，包括本文所描述之方法。在一些實施例中，在包含複數個非海藻糖基化抗體之組合物中海藻

糖為不可偵測的。在一些實施例中，非海藻糖基化抗體具有增強之ADCC活性。

【0367】 在一些實施例中，提供具有缺乏連接(直接或間接)至Fc區之海藻糖的碳水化合物結構之抗體(亦即非海藻糖基化抗體)。舉例而言，包含複數個此類抗體之組合物中海藻糖之量可為0-30%、0-20%、0-15%、1-10%或0-5%。

【0368】 在一些實施例中，包含複數個本發明之抗體之組合物包含>80%、85%、90%、95%、97%、99%或>99.5%非海藻糖基化抗體。在一些實施例中，抗體在偵測極限內為100%非海藻糖基化的(亦即，海藻糖為使用此項技術認可之用於偵測抗體(諸如本文所描述之抗體)中之海藻糖的方法在Asn297處不可偵測的/未偵測到的)。可藉由相對於連接至Asn 297之所有糖結構(例如複合物、雜合物及高甘露糖結構)之總和計算糖鏈內在Asn297處之海藻糖的平均量來確定海藻糖之量。

【0369】 在一些實施例中，海藻糖基化之水準不超過0.5%，此係基於測試方法之定量極限(LOQ)。因此，在一些實施例中，非海藻糖基化之水準大於或等於99.5%。

【0370】 N-鍵聯寡醣分析法可用於確定樣品中海藻糖基化、唾液酸化、甘露糖基化及末端半乳糖基化之水準。N-鍵聯寡醣法可用於評估N-鍵聯聚醣。簡單來說，使用肽-N-糖苷酶F使N-鍵聯聚醣自蛋白質酶促釋放。接著藉由螢光劑對聚醣進行衍生化且使用親水性相互作用液相層析及螢光偵側進行分析。接著將層析型態與參考材料進行比較。此方法及此項技術中已知之許多其他方法均可用於評估抗體之海藻糖基化程度，且可用於確定存在於本發明之抗體中之海藻糖基化的水準。

【0371】 偵測抗體中之海藻糖之非限制性示例性方法包括MALDI-TOF質譜法(參見例如WO 2008/077546)、所釋放之螢光標記寡醣之HPLC量測(參見例如

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))、所釋放之螢光標記寡醣之毛細管電泳量測(參見例如Ma等人, *Anal. Chem.*, 71: 5185-5192 (1999))及使用脈衝電流偵測來量測單醣組成之HPLC (參見例如Hardy等人, *Analytical Biochem.* 170: 54-62 (1988))。

【0372】 Asn297係指位於Fc區中約位置297 (Fc區殘基之EU編號)之天冬醯胺殘基；然而，Asn297亦可因抗體中之微小序列變異而位於位置297上游或下游約加上或減去3個胺基酸處，亦即，在位置294與300之間。在本文所描述之CXCR5抗體中，Asn297可見於序列基元QYNST (SEQ ID NO: 166)中。

【0373】 海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能。參見例如US 2003/0157108及US 2004/0093621。與「非海藻糖基化」或「海藻糖缺陷型」抗體有關之出版物之實例包括：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等人, *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004) (全部以引用之方式併入本文中)。

【0374】 能夠產生非海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之Lec 13 CHO細胞(Ripka等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986))；US 2003/0157108 A1；及WO 2004/056312 (參見實例11)；及敲除細胞株，諸如缺乏功能性α-1,6-海藻糖基轉移酶基因FUT8之細胞株，例如敲除CHO細胞(參見例如Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda等人,

Biotechnol. Bioeng, 94(4):680-688 (2006)；及WO2003/085107)。

【0375】 在某些實施例中，本發明之抗體具有二等分寡醣，例如其中連接至抗體之Fc區的雙觸角寡醣由GlcNAc二等分。此類抗體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能。此類抗體之實例描述於例如WO 2003/011878；美國專利第6,602,684號；及US 2005/0123546中。

【0376】 在某些實施例中，本發明之抗體在連接至Fc區之寡醣中具有至少一個半乳糖殘基。此類抗體可具有改良之CDC功能。此類抗體描述於例如WO 1997/30087；WO 1998/58964；及WO 1999/22764 (全部以引用之方式併入本文中)中。

【0377】 在一些實施例中，本發明之非海藻糖基化抗體在存在人類效應細胞之情況下比包含海藻糖之對照/親本抗體更有效地介導ADCC。通常，可使用如本文所揭示之活體外ADCC分析來確定ADCC活性，但涵蓋其他用於確定ADCC活性之分析或方法(例如在動物模型中等)。

【0378】 在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體具有增強之活體外及/或活體內ADCC活性。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體具有增強之活體外ADCC活性。在一些實施例中，藉由本文所描述之方法來確定活體外ADCC活性。簡單來說，將抗CXCR5抗體或同型對照之連續稀釋液與來自健康人類供體或食蟹猴之外周血單核細胞(PBMC)一起孵育。在此分析中，PBMC為自然殺傷(NK)效應細胞及目標$CXCR5^+$ B及Tfh樣細胞之來源。使用流式細胞術來定量約20 h後剩餘之B及Tfh樣細胞的數目。藉由將抗原結合群體之細胞毒性百分比針對PF-06835375抗體濃度之對數進行繪圖來產生細胞毒性滴定曲線。使用GraphPad Prism (6.0版，GraphPad Software, Inc, San Diego, CA)非線性回歸曲線擬合及促效劑劑量-反應模型之S形對數根據以下等式來確定EC50值：

Log (促效劑)與反應-可變斜率(四個參數)

Y =底部+ (頂部-底部/(1+ 10^((LogEC$_{50}$ - X)*希爾斜率)

其中Y為細胞毒性之百分比，X為抗體濃度，頂部為對應於S形曲線之上部平台之最大Y值，底部為對應於S形曲線之下部平台之最小Y值(限定至0)，且LogEC50為曲線拐點處之抗體濃度之對數。

【0379】 在實驗中使用平均值及標準偏差(STDEV)概述EC50值。

【0380】 在一些實施例中，使用自扁桃體單核細胞分離之CD4+ T細胞且添加自PBMC分離之NK細胞類似地評估人類化mAb誘導來自人類扁桃體之真正Tfh細胞之ADCC的能力。

【0381】 在一些實施例中，表現CXCR5之Ba/F3細胞用作目標細胞。在一些實施例中，藉由使用CytoTox非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI)定量LDH釋放來確定細胞毒性。

【0382】 在一些實施例中，使用5% Triton X-100來確定最大溶解且在不存在抗體之情況下確定自發釋放。在一些實施例中，可使用下式來確定特異性溶解之百分比：(實驗-自發釋放)/(最大-自發釋放) x 100 = 特異性溶解%。

【0383】 在一些實施例中，在所測試之至少一種抗體濃度下，與使用相同量之海藻糖基化抗體之特異性溶解相比，具有增強之ADCC活性之非海藻糖基化抗CXCR5抗體產生大至少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個百分點之特異性溶解。

【0384】 在一些實施例中，與使用海藻糖基化抗體之特異性溶解相比，具有增強之ADCC活性之非海藻糖基化抗CXCR5抗體產生大至少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個百分點之特異性溶解，其中各抗體在0.01與1微克/毫升(microg/ml)之間的濃度下且目標細胞為表現CXCR5之Ba/F3細胞。

【0385】 在一些實施例中，在0.000005微克/毫升至5微克/毫升範圍內之濃度下對抗體進行測試。

【0386】 在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體對FcγRIIIA具有增強之親和力。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體對FcγRIIIA(V158)具有增強之親和力。在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體對FcγRIIIA(F158)具有增強之親和力。在一些實施例中，抗體對FcγRIIIA之親和力使用表面電漿子共振及/或如下來確定，其參考FcγRIIIA (V158)進行描述，但其亦適合確定對FcγRIIIA (F158)之親和力。

【0387】 簡單來說，在一些實施例中，將海藻糖基化或非海藻糖基化抗CXCR5抗體捕獲於蛋白質A塗佈之右旋糖酐晶片上。以各種濃度注射FcγRIIIA (V158) (可購自例如R and D Systems)。海藻糖基化及非海藻糖基化抗CXCR5抗體之締合常數、解離常數及FcγRIIIA (V158)親和力可例如使用與表面電漿子共振系統一起提供之軟體(例如Biacore T200評估軟體1:1結合模型)來確定。

【0388】 在一些實施例中，非海藻糖基化抗CXCR5抗體可對FcγRIIIA (諸如FcγRIIIA (V158)或FcγRIIIA (F158))具有增強之親和力，且可以比海藻糖基化抗CXCR5抗體大至少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倍之親和力結合至FcγRIIIA。

10. 編碼本發明之抗體之核酸分子

【0389】 本發明亦提供包含編碼本文所描述之抗體之一或多條鏈之聚核苷酸的核酸分子。在一些實施例中，核酸分子包含編碼本文所描述之抗體之重鏈或輕鏈的聚核苷酸。在一些實施例中，核酸分子包含編碼本文所描述之抗體之重鏈的聚核苷酸與編碼輕鏈之聚核苷酸兩者。在一些實施例中，第一核酸分子包含編碼重鏈之第一聚核苷酸且第二核酸分子包含編碼輕鏈之第二聚核苷酸。

【0390】 在一些此類實施例中，重鏈及輕鏈自一個核酸分子或自兩個單獨核酸分子表現為兩種單獨多肽。在一些實施例中，諸如當抗體為scFv時，單一聚核苷酸編碼包含鍵聯在一起之重鏈與輕鏈的單一多肽。

【0391】 在一些實施例中，編碼本文所描述之抗體之重鏈或輕鏈之聚核苷酸包含編碼前導序列之核苷酸序列，其在轉譯時定位於重鏈或輕鏈之N端。如上文所論述，前導序列可為天然重鏈或輕鏈前導序列，或可為另一異源前導序列。

【0392】 核酸分子可使用此項技術中習知之重組DNA技術來構築。在一些實施例中，核酸分子為適合在所選宿主細胞(諸如哺乳動物細胞)中表現之表現載體。

11. 載體

【0393】 提供包含編碼本文所描述之抗體之重鏈及/或輕鏈之聚核苷酸的載體。此類載體包括但不限於DNA載體、噬菌體載體、病毒載體、逆轉錄病毒載體等。在一些實施例中，載體包含編碼重鏈之第一聚核苷酸序列及編碼輕鏈之第二聚核苷酸序列。在一些實施例中，重鏈及輕鏈自載體表現為兩種單獨多肽。在一些實施例中，重鏈及輕鏈表現為單一多肽之一部分，諸如當抗體為scFv時。

【0394】 在一些實施例中，第一載體包含編碼重鏈之聚核苷酸且第二載體包含編碼輕鏈之聚核苷酸。在一些實施例中，將第一載體及第二載體以類似量(諸如類似莫耳量或類似質量)轉染至宿主細胞中。在一些實施例中，將莫耳比或質量比介於5:1與1:5之間的第一載體及第二載體轉染至宿主細胞中。在一些實施例中，使用質量比介於1:1與1:5之間的編碼重鏈之載體與編碼輕鏈之載體。在一些實施例中，使用質量比為1:2之編碼重鏈之載體與編碼輕鏈之載體。

【0395】 在一些實施例中，選擇針對多肽在CHO或CHO源性細胞中或NSO細

胞中之表現優化的載體。示例性此類載體描述於例如Running Deer等人, Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004)中。在一些實施例中，載體經選擇用於本發明抗體在包括人類之動物中之活體內表現。在一些此類實施例中，多肽之表現受以組織特異性方式發揮功能之啟動子的控制。舉例而言，肝臟特異性啟動子描述於例如PCT公開案第WO 2006/076288號中。

12. 宿主細胞

【0396】 本發明之另一態樣提供一種宿主細胞，該宿主細胞包含編碼本發明之抗CXCR5抗體中之任一者的核酸分子及/或包含該核酸分子之載體。

【0397】 在各個實施例中，本文所描述之抗體之重鏈及/或輕鏈可在原核細胞，諸如細菌細胞中；或真核細胞，諸如真菌細胞(諸如酵母)、植物細胞、昆蟲細胞及哺乳動物細胞中表現。此類表現可例如根據此項技術中已知之程序來進行。

【0398】 可用於表現多肽之示例性真核細胞包括但不限於COS細胞，包括COS 7細胞；293細胞，包括293-6E細胞；CHO細胞，包括CHO-S及DG44細胞；PER.C6®細胞(Crucell)；及NSO細胞。

【0399】 在某些實施例中，細胞為哺乳動物細胞。在某些實施例中，宿主細胞為CHO細胞、COS細胞、HEK-293細胞、NS0細胞、PER.C6®細胞或Sp2.0細胞。在某些實施例中，宿主細胞缺乏功能性α-1,6-海藻糖基轉移酶(FUT8)。在某些實施例中，宿主細胞不表現功能性α-1,6-海藻糖基轉移酶酶。在某些實施例中，細胞缺乏編碼功能性酶之FUT8基因。在某些實施例中，宿主細胞缺乏編碼功能性FUT8基因之基因。在某些實施例中，宿主細胞為Potelligent® CHOK1SV細胞，或Lec13 CHO細胞。在某些實施例中，宿主細胞為Potelligent® CHOK1SV細胞。

【0400】 在一些實施例中，本文所描述之抗體之重鏈及/或輕鏈可在酵母中表

現。參見例如美國公開案第US 2006/0270045 A1號。在一些實施例中，基於對CXCR5抗體之重鏈及/或輕鏈進行所需轉譯後修飾之能力選擇特定真核宿主細胞。舉例而言，在一些實施例中，CHO細胞產生比293細胞中所產生之相同多肽相比具有更高水準之唾液酸化的多肽。

【0401】 將一或多種核酸引入所需宿主細胞中可藉由任何方法來實現，包括但不限於磷酸鈣轉染、DEAE-右旋糖酐介導之轉染、陽離子脂質介導之轉染、電穿孔、轉導、感染等，非限制性示例性方法描述於例如Sambrook等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第3版Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)中。可根據任何合適之方法將核酸在所需宿主細胞中瞬時或穩定轉染。

【0402】 在一些實施例中，可在動物中活體內產生一或多種多肽，該動物已根據任何合適之方法工程改造或用一或多個編碼多肽之核酸分子轉染。

【0403】 因此，本發明之另一相關態樣提供一種製備抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括將本文所描述之本發明之宿主細胞(例如包含本發明之抗體或其功能性抗原結合片段中之任一者之聚核苷酸編碼序列的彼等宿主細胞)在其中該抗體或抗原結合片段由該宿主細胞表現之條件下進行培養。

【0404】 在某些實施例中，該方法進一步包括分離該抗體或其抗原結合片段。

【0405】 在相關態樣中，本發明提供一種製備非海藻糖基化抗CXCR5抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括培養包含本發明之核酸分子或本發明之載體的宿主細胞，其中宿主細胞缺乏功能性FUT8。

【0406】 在某些實施例中，宿主細胞為Potelligent® CHOK1SV細胞。

【0407】 本發明之另一相關態樣提供一種使用本發明之方法產生之分離之抗體或其抗原結合片段。

【0408】 在某些實施例中，本發明之分離之抗體或其抗原結合片段為非海藻

糖基化的。

【0409】 在某些實施例中，與海藻糖基化之以其他方式相同之抗體或其抗原結合片段相比，非海藻糖基化抗體或其抗原結合片段展現增強之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

【0410】 在某些實施例中，非海藻糖基化抗體或其抗原結合片段展現比海藻糖基化之以其他方式相同之抗體或其抗原結合片段大約2倍、約5倍、約7倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約110倍、約120倍、約130倍、約140倍及約143倍的ADCC。

【0411】 本發明之另一相關態樣提供一種醫藥組合物，該醫藥組合物包含本發明之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段為非海藻糖基化的。

實例

實例1 嵌合抗CXCR5單株抗體之鑑定及初步表徵

【0412】 使用不同設計進行三個免疫週期，此產生總共185個候選鼠單株抗體，其中54個經證實為CXCR5之結合劑。經驗證之結合劑中有六個具有高結合親和力，經表徵為MFI>50%之基準抗體信號，及>80%之陽性細胞。

【0413】 接著基於鼠抗體之可變(VH及VL)區及人類IgG1之hIgG1支架/恆定區產生嵌合單株抗體。以與使用同型對照獲得之百分比相比>1個對數之陽性細胞之百分比的形式對特異性抗體進行表徵。

使用活體外分析選擇候選嵌合抗體

【0414】 接著對嵌合抗體進行一系列活體外表徵將此等抗體按優先順序列出。特定而言，六種強結合劑之表徵係基於與在表現相關靶標之細胞上之結合、特異性分析及藉由流式細胞術進行之交叉反應性分析不同之關鍵活體外分析。建立若干二階分析以基於對B細胞遷移之功能效應、酶促細胞內促效活性

及受體內化對強結合劑進行排列。最重要的是，接著在抗體依賴性細胞細胞毒性(ADCC)報告子分析中對強候選物進行表徵，因為ADCC為強候選抗體之所需作用模式。ADCC報告子分析之讀數為來自驅動螢光蟲螢光素酶表現之NFAT反應元件之發光信號。

【0415】 為測試對CXCR5之結合能力，在結合分析中使用表現目標抗原hCXCR5之黏附穩定細胞株對六種嵌合單株抗體進行測試。結果表明，所有六種嵌合抗體均以不同結合特性結合至表現目標抗原之細胞。其中，與HFB2-1-hG1及HFB2-2-hG1相比，嵌合抗體HFB2-3-hG1、HFB2-4-hG1、HFB2-5-hG1及HFB2-6-hG1顯示更高之結合能力。除一種外所有嵌合抗體均顯示亞nM EC50值。參見圖5。

【0416】 接下來，交叉反應性結合評估表明，與分析中所包括之陽性對照相比，嵌合單株抗體均不與猴或鼠CXCR5異種同源物交叉反應。參見圖6A。另外，抗hCXCR5嵌合抗體均不結合至hCXCR5異種同源物hCXCR3，因此證實其特異性。參見圖6B。

【0417】 由於目標抗原CXCR5為參與趨化性之GPCR，故進行實驗以證實本發明抗體抑制活體外B細胞遷移之能力。作為特異性抗體排列分析之一，B細胞遷移分析使用表現CXCR5目標抗原之M300.19懸浮細胞來測試所有抗體候選物以及基準/對照抗體。如下計算此分析中之抑制程度：抑制%= (1-遷移%/無抗體情況下之遷移%之平均值) * 100。

【0418】 為進行分析，製備一式三份之10 nM至0.1 nM之三種抗體稀釋液，用於在37°C下進行6-h孵育。在Cytoflex上對細胞進行計數，對表現CXCR5目標抗原之M300.19細胞重複兩次(n=2)。

【0419】 結果表明，候選抗體顯示不同抑制特性，且至少其中一些能夠抑制配位體(CXCL13)誘導之趨化性。抑制此類趨化性最有效之抗體候選物為嵌合抗

體HFB2-4-hG1，其在約1 nM下達至100%抑制。參見圖7。

【0420】 另外，在cAMP分析中對強結合劑進行測試以證實其促效/拮抗特性。評估候選抗體在由CXCL13配位體活化後是否可阻斷細胞內cAMP水準。分析係基於以下原理：可量測之化學發光信號與細胞中之cAMP的量成正比。在用Gαi路徑中之配位體活化後，預期cAMP降低。化學發光信號增加與cAMP水準反相關。

【0421】 cAMP分析顯示6種候選抗體之不同功能特性。特定而言，與其他4種候選抗體相比，HFB2-4-hG1及HFB2-5高效地阻斷CXCL13誘導之細胞內cAMP信號傳導，且兩者均優於基準抗體。圖8。

【0422】 歸因於本發明抗體之所需目標產物型態，亦在ADCC報告子生物分析中對六種強嵌合結合劑進行測試。

【0423】 ADCC為使帶有之Fc受體效應細胞可識別及殺死抗體(Ab)塗佈之在表面表現抗原之目標細胞的免疫機制。ADCC由抗原結合之Ab與免疫效應細胞表面之Fc受體CD16A之間的交聯觸發。此等相互作用誘導細胞內鈣濃度增加、鈣調神經磷酸酶/鈣調素介導之NFAT去磷酸化，從而允許其核轉位及結合至ADCC相關基因之啟動子區。最終，效應細胞釋放殺死目標細胞之細胞毒性顆粒。在報告子生物分析中，將效應細胞設計為效應報告細胞，因為此等細胞在融合至多個NFAT反應元件之最小啟動子控制下穩定表現報告基因，諸如螢光素酶報告基因。在此系統中，將ADCC誘導量測為在由抗原結合之抗體活化CD16A信號傳導後且在添加適當偵測試劑後由螢光素酶產生之生物發光信號。

【0424】 具有已知作用模式之抗CD20抗體在此分析中用作陽性對照。雖然不同候選抗體顯示明顯不同之ADCC能力，但HFB2-4-hG1顯示在CD16接合中具有最佳效能。圖9A。

【0425】 概括地說，從54種特異性抗CXCR5抗體中鑑定了六種單位數萘莫耳

親和力嵌合結合劑(亦即，HFB2-1-hG1、HFB2-2-hG1、HFB2-3-hG1、HFB2-4-hG1、HFB2-5-hG1、HFB2-6-hG1)。此六種強結合劑之表徵顯示各種特性。均不與CXCR5之鼠或猴異種同源物交叉反應。其全部為靶標特異性的，且不識別最靠近之同源物CXCR3。

HFB2-4hG1之藥物動力學(PK)評估

【0426】 基於如cAMP、趨化性及ADCC之三種不同功能測試，HFB2-4hG1似乎為最有前途且有效之候選物，且選擇用於PK評估。參見小鼠中HFB2-4hG1嵌合抗體之有利PK型態(圖3)。

【0427】 在8-10週齡野生型(wt) C57BL/6J小鼠中進行HFB2-4-hG1之藥物動力學(PK)研究。通過尾部靜脈以如1mg/kg及10 mg/kg之兩種不同濃度靜脈內投與HFB2-4-hG1。在8個不同時間點(在1h、2h、4h、8h、24h、48h、72h及7天時)自各小鼠收集約50 μL之血漿樣品。使用內部優化之標準方案藉由ELISA定量各樣品中之人類IgG水準。結果表明HFB2-4-hG1展現有利PK型態($t_{1/2}$ = 158 h)。

DE突變對HFB2-4hG1之ADCC活性之影響

【0428】 鑒於HFB2-4hG1抗體在其他5種強hCXCR5結合劑中顯示最佳CD16接合之事實，選擇在DE支架(S239D/I332E)中產生HFB2-4hG1抗體以增強ADCC活性。在包括抗CD20陽性對照抗體之ADCC報告子生物分析中對HFB2-4-hG1與HFB2-4-hG1DE抗體兩者進行測試。正如所料，結果清楚地證實，HFB2-4誘導比對照抗CD20抗體更高程度之CD16接合，且表明DE支架進一步增加抗體之ADCC特性(在$E_{最大}$與EC_{50}兩者中)，並且活性比陽性對照抗體抗CD20更佳。圖9B。

【0429】 接下來，藉由使用自表現靶標之健康供體外周血單核細胞(PBMC)分離之原代NK細胞(效應細胞)及Raji細胞(目標細胞)測試HFB2-4hG1DE之ADCC活性。資料表明HFB2-4hG1DE介導原代NK細胞以0.76 pM EC50值溶解

Raji細胞，此比利妥昔單抗陽性對照抗體更有效。參見圖9C。

【0430】 另外，藉由使用表現靶標之原代NK細胞(效應細胞)及原代B細胞(目標細胞)進一步測試HFB2-4hG1DE之ADCC活性；兩種原代細胞群體分離自不同健康供體之PBMC。HFB2-4hG1DE誘導原代NK細胞以0.44 fM EC50值溶解外周B細胞，此亦比利妥昔單抗陽性對照抗體更有效。參見圖9D。亦進行類似實驗以檢驗HFB2-4hG1DE關於溶解人類原代T細胞之ADCC活性，且發現HFB2-4hG1DE亦誘導hCXCR5+ CD4+原代T細胞之強NK介導之溶解。參見圖9E。

【0431】 進行另一類似實驗以檢驗非海藻糖基化HFB2-4hG1 (無DE突變)單株抗體(AfuHFB2-4hG1)關於溶解人類原代T細胞之ADCC活性。發現與無抗體對照(單獨CD4+細胞，在存在或不存在NK細胞之情況下)相比，AfuHFB2-4hG1亦在極廣泛範圍之抗體濃度內以劑量依賴性方式誘導hCXCR5+ CD4+原代T細胞之強NK介導之溶解(參見圖9F)，而利妥昔單抗(hG1) (其靶向表現CD20表面抗原之B細胞)及同型對照抗體MGO53-hG1在廣泛範圍之抗體濃度內基本上沒有影響。參見圖9F。

HFB2-4hG1之活體內抗腫瘤活性

【0432】 在基於癌細胞株(Raji及Daudi細胞)獲得結合資料之後，僅使用基於Raji細胞之腫瘤模型在CB17-SCID免疫缺陷小鼠中進行活體內研究。簡單來說，在6-8週齡CB-17 SCID小鼠中皮下接種Raji細胞。研究中包括四個不同組；同型對照(MGO53-hG1)、PBS對照、陽性對照(HFB2-利妥昔單抗-hG1)及先導候選物組(HFB2-4-hG1)。處理由每三天以10 mg/kg腹膜內(i.p.)投與抗體中之一者持續21天構成。每三天對各小鼠之腫瘤生長及體重進行量測。

【0433】 在類似於利妥昔單抗對照之Raji異種移植模型中，投與HFB2-4hG1 (10 mg/kg，BIWx7，腹膜內)產生有效抗腫瘤活性。參見圖16。

【0434】 概括地說，HFB2-4 (hG1及hG1DE)嵌合抗hCXCR5抗體顯示與表現

CXCR5之細胞的強結合，有效抑制配位體誘導之遷移及信號傳導，在小鼠中展現有利PK型態，在Raji異種移植鼠模型研究中顯示抗腫瘤活性，介導關於原代NK細胞針對Raji B細胞淋巴瘤細胞株與原代B細胞兩者之強ADCC。基於活體外及*e*中產生之資料，證實先導抗體系列HFB2-4 (hG1及hG1DE)為最適合於人類化之候選物。

實例2　人類化抗體之表徵

【0435】　基於HFB2-4-hG1，使用CDR接枝，藉由選擇來自鼠抗體序列之負責抗體之抗原識別的互補決定區(CDR)且將其接枝至hIgG1之人類構架區(FR)中來產生人類化抗hCXCR5單株抗體。

【0436】　總體來說，使用CDR接枝產生總共25種人類化變異體。與親本嵌合抗體相比，彼等變異體大部分保留其物理化學活性(對靶標之親和力、穩定性、溶解度)及/或生物活性(阻斷或刺激靶標、ADCC)。

【0437】　簡單來說，12種基於HFB2-4之人類化抗體變異體(亦即，HFB2-4hz)中的10種顯示與親本嵌合抗體HFB2-4類似之與hCXCR5之結合。此外，12種HFB2-4hz變異體中的9種阻斷cAMP信號傳導，該等結果與結合結果一致。此外，觀測到由人類化變異體引起之有效趨化性抑制，其中HFB2-4hz12為最有效的(在0.1 nM下約100%)。在後續實驗中，在HFB2-4Hz9與HFB2-4Hz12之間亦發現類似效能。

【0438】　遵循用於嵌合單株抗體之活體外表徵的相同程序(參見實例1)對人類化抗hCXCR5單株抗體進一步表徵。除關鍵及2階表徵分析外，人類化變異體表徵中亦包括可開發性評估測試。

抗體內化之評估

【0439】　藉由Incucyte抗體內化及pHAb活性染料(Promega)分析對由表現相關抗原(例如CXCR5)之細胞引起之抗體內化進行評估。

【0440】 抗原介導之抗體內化在若干基於抗體之治療劑中起重要作用。視所需作用模式而定，可能需要具有在結合細胞表面抗原後優先內化至目標細胞中之抗體(諸如高毒性藥物經由抗體藥物結合物(ADC)遞送至癌細胞及癌細胞之表面受體(亦即EGFR)之移除或降解)，或優先保持結合至細胞表面之抗體(諸如針對免疫細胞殺傷作用(亦即ADCC或ADCP)對腫瘤細胞進行鑑定)。另外，量測及優化對抗體之功能反應(諸如抗體清除)為極其重要的。舉例而言，胞飲作用為抗體之主要消除途徑之一，在抗體開發期間需要針對定性藥物動力學量測進行抗體優化。由於各方法需要一系列抗體特徵，例如以實現維持在細胞表面以便鑑定腫瘤細胞或當遞送ADC時快速內化，重要的是理解抗體候選物之攝入型態及清除以便獲得最佳抗體工程改造及內化特徵。

【0441】 IncuCyte® FabFluor抗體標記試劑為結合至pH敏感性螢光探針之Fc區靶向Fab片段。此等試劑使所有同型匹配之含有Fc之測試抗體能夠使用通用一步無洗滌標記方案。在pH 7.0下，Fab-Ab複合物幾乎沒有螢光。當將標記抗體添加至細胞中時，在Fab-Ab複合物內化且經由酸性(pH 4.5-5.5)溶酶體及內體加工時觀測到螢光信號。內化之整個時間過程可目視觀察且使用實時活細胞分析進行自動定量。

【0442】 pHAb染料為pH值感測染料，其在pH ＞7下具有極低之螢光，且隨溶液之pH值變為酸性，螢光顯著增加。pHAb染料具有532 nm之最大激發(Ex)波長及560 nm之最大發射(Em)波長。pHAb染料經設計特定而言用於標記抗體。舉例而言，pHAb胺活性染料(a)具有與在抗體上之離胺酸胺基酸上可獲得之一級胺反應的丁二醯亞胺基酯基。

【0443】 自兩種分析獲得之結果表明，與陽性對照(CD71)抗體相比，HFB2-4hz9-hG1DE與HFB2-4hz12-hG1DE均不內化。圖10A-10B。

人類化變異體之ADCC活性

【0444】 人類化抗體中之兩者(HFB2-4hz9-hG1DE及HFB2-4hz12-hG1DE)顯示與親本嵌合抗體HFB2-4-hG1DE相同程度之有效ADCC活性。正如所料，與人類化變異體相比，hG1支架中之HFB2-4及基準抗體具有更低之ADCC活性。如先前在HFB2-4hz9-hG1DE及HFB2-4hz12-hG1DE情況下所顯示，兩種其他人類化變異體(HFB2-4hz14-hG1DE及HFB2-4hz15-hG1DE)之結果亦顯示高效接合CD16從而誘導ADCC。參見圖11A及11B。

【0445】 為優化涵蓋基於休格蘭症候群患者樣品之ADCC活性之分析條件，使用自來自健康供體之外周血單核細胞(PBMC)分離之原代B細胞。特定而言，基於流式細胞術分析針對原代B細胞上之目標抗原CXCR5表現對若干健康供體進行篩查。使用具有高原代B細胞CXCR5表現之供體對ADCC報告子生物分析之條件(如效應子靶標比率)進行優化。Jurkat細胞(Promega)用作報告效應細胞，用於量測由其由CD16介導之歸因於ADCC之信號傳導活化之報告螢光素酶發射之螢光信號。

【0446】 結果表明，親本嵌合抗體以及其人類化變異體針對原代B細胞展現ADCC活性。參見圖13，該圖顯示人類化變異體中之一者(HFB2-4Hz12-hG1DE)之ADCC報告子分析之結果。人類化抗體針對表現CXCR5之原代B細胞展現ADCC效應。

人類化變異體之活體內抗腫瘤活性

【0447】 在活體內靜脈內Raji異種移植模型中評估HFB2-4hz42 (在小鼠IgG2a模式中)誘導抗腫瘤活性之能力。用Raji細胞接種每組8只小鼠，且將小鼠用HFB2-4hz42或小鼠IgG2a模式中之同型或作為陽性對照之利妥昔單抗(hG1模式)處理。另外，亦包括未經處理之組原初小鼠。每三天為小鼠腹膜內注射10mg/kg之測試抗體持續15天。如以下結果表格中所示，與用同型對照抗體處理之小鼠相比，投與HFB2-4hz42mIgG2使得存活顯著增加。

組	中值 存活	P值(與G1比較)	P值 (與G3比較)
G1，MGO53-mG2a， 10 mpk	22	-	-
G2，HFB2-4hz42-mIgG2a，10 mpk	40	＜0.0001****	0.0023**
G3，利妥昔單抗(hG1) 10 mpk	全部存活	＜0.0001****	-

實例3　人類化抗體之癌症靶標之鑑定

【0448】　在活體內功效模型選擇之前，選擇8種不同癌細胞株進行篩查以證實活體外目標CXCR5表現。

【0449】　藉由流式細胞術進行之結合評估證實HFB2-4hz12-hG1DE以類似於利妥昔單抗(用於治療非霍奇金氏淋巴瘤及慢性淋巴細胞性白血病之抗CD20單株抗體)之程度結合至Raji及Daudi細胞，但不大量結合至任何其他所選癌細胞株。參見圖14。

【0450】　接著在不同效應子:靶標比率(1:1及3:1)下，基於B細胞淋巴瘤細胞株(Raji及Daudi細胞)對此人類化抗體之ADCC活性進行評估。如前所述，在ADCC報告子分析使用Raji細胞使用已經設定之實驗條件進行嵌合及人類化變異體抗體之活體外表徵，且在ADCC報告子分析中僅測試Daudi細胞。資料表明HFB2-4hz12-hG1DE針對Daudi細胞具有大於由對照抗CD20抗體展現之ADCC活性的ADCC活性。參見圖15。

實例4　對休格蘭患者之B細胞的ADCC活性

【0451】　為證實本發明抗體在治療休格蘭症候群(SS)中之潛在功效，使用ADCC報告子分析來表明本發明之人類化單株抗體HFB2-4hz12hIgDE可高效地接合CD16，從而誘導對自獲自經處理之SS患者之冷凍材料分離的B細胞之ADCC效應。參見圖17。

【0452】　特定而言，自獲自2個先前經處理之SS患者之冷凍PBMC樣品分離B細胞，且用於如上文所描述之ADCC報告子分析。實驗中使用各抗體之11 nM-

0.005nM之三倍連續稀釋液。結果表明HFB2-4hz12hIgDE高效地接合CD16從而誘導ADCC。

【0453】 其他資料表明，HFB2-4hz12-hG1降低SS患者之樣品中記憶B細胞群體之百分比。參見圖18。

【0454】 如先前所描述，亦基於來自SS患者之B細胞使用ADCC報告子分析(Promega)對HFB2-4hG1DE進行測試。觀測到與呈hG1模式之利妥昔單抗相比，HFB2-4hG1DE具有更高之CD16接合且誘導強得多之ADCC讀數。(圖9B-9C)。

【0455】 總體來說，迄今為止獲得之結果表明人類化抗hCXCR5 IgG1抗體對人類CXCR5具有nM親和力，且在表現hCXCR5之B細胞、休格蘭症候群(SS)患者之生髮中心中之潛在濾泡輔助T細胞/B細胞中誘導ADCC。

實例5 其他系列之人類化變化之產生及表徵

【0456】 藉由將不同可變重鏈及可變輕鏈組合，基於HFB2-4hG1 (HFB2-4hz-hG1)產生36種其他人類化變異體。使用類似於實例1或如實例1中所描述之方法對此等抗體進行表徵。

【0457】 在兩種不同濃度1 nM及0.1 nM下在對Raji細胞之結合分析中測試此36種人類化變異體之結合特性。36種人類化變異體全部對Raji細胞展現顯著結合型態。參見圖19A及19B。

【0458】 在8週至10週齡野生型C57BL/6J小鼠中對排名最靠前的九種人類化變異體進行藥物動力學研究(各人類化變異體n=3)。以10 mg/kg之濃度以單次劑量由尾部靜脈內(i.v.)投與各人類化變異體mAb。在如1h、24h、96h，包括時間0時之處理前劑量之四個不同時間點，自各小鼠收集50 μL之血漿樣品。使用內部優化之標準方案藉由ELISA定量各樣品中之人類IgG水準。九種人類化變異體全部展現與親本HFB2-4hG1類似之PK型態。參見圖20。選擇表2中所列之排名最靠前的六種人類化變異體用於進一步活體外及活體內表徵。

表2. 基於HFB2-4hG1之其他系列之中的排名最靠前的六種人類化變異體

Ab名稱		重鏈名稱	輕鏈名稱	VH人類化水準%	VL人類化水準%	PI
親本抗體	HFB2-4hG1	VH3	VL4			
HFB2-4hz37hG1	HFB2-VH3VL6	pHFB-HFB2-**VH3**	pHFB-HFB2-**VL6**	87.40%	80.60%	8.65
HFB2-4hz38hG1	HFB2-VH3VL7	pHFB-HFB2-**VH3**	pHFB-HFB2-**VL7**		83%	8.5
HFB2-4hz39hG1	HFB2-VH6VL6	pHFB-HFB2-**VH6**	pHFB-HFB2-**VL6**	85.40%	81%	8.76
HFB2-4hz41hG1	HFB2-VH8VL7	pHFB-HFB2-**VH8**	pHFB-HFB2-**VL7**	78,10%	83%	8.5
HFB2-4hz42hG1	HFB2-VH10VL6	pHFB-HFB2-**VH10**	pHFB-HFB2-**VL6**	88.50%	81%	8.71
HFB2-4hz45hG1	HFB2-VH11VL7	pHFB-HFB2-**VH11**	pHFB-HFB2-**VL7**	78,10%	83%	8.5

【0459】 排名最靠前的6種HFB2-4hz-hG1變異體全部展現類似之對Raji細胞之結合型態及在報告子系統中接合CD16之ADCC活性。參見圖21。

【0460】 值得注意的是，在排名最靠前的6種候選物中，HFB2-4hz41hG1及HFB2-4hz45hG1展現較低之人類化水準。因此，將此兩種變異體排除在列表外，留下4種變異體用於進一步表徵。

【0461】 為增強最佳之四種人類化變異體之ADCC活性，以hG1DE模式產生此等變異體。針對與表現目標CXCR5之黏附細胞DX002-CHOK1之結合對呈hG1DE模式之排名最靠前的四種人類化變異體進行測試。人類化變異體顯示類似於HFB2-4hG1DE親本抗體之效能。參見圖22。

【0462】 為研究DE模式是否影響抗體之藥物動力學(PK)型態，在8週至10週齡野生型C57BL/6J小鼠中在hG1及hG1DE支架中之人類化變異體中進行snapshot PK研究(各人類化變異體n=1)。以10 mg/kg之濃度以單次劑量由尾部靜脈內投與各人類化變異體抗體。在如1h、24h、96h，包括時間0時之處理前劑量之四個不同時間點自各小鼠收集50 μL之血漿樣品。使用內部優化之標準方案藉由ELISA定量各樣品中之人類IgG水準。人類化變異體展現類似於具有相同模式之親本抗體之PK型態。

概述

【0463】 總體來說，產生了36種人類化變異體且進行了測試。保留HFB2-4hz37hG1、HFB2-4hz38hG1、HFB2-4hz39hG1及HFB2-4hz42hG1用於鑑定先導候選抗體。四種人類化變異體具有與具有類似活體外結合及生物特性之HFB2-4hG1-DE非常類似之型態。

【0464】 然而，在PK分析中，HFB2-4hz39hG1具有較短之半衰期。關於可開發性型態，HFB2-4hz42hG1表現得稍微更好。關於cIEF型態，HFB2-4hz42hG1及HFB2-4hz37hG1顯示最合適之型態。參見表3。

【0465】 因此，選擇HFB2-4hz42hG1及HFB2-4hz37hG1作為先導及後備抗體且將針對活體內功效研究進行進一步測試。其VH及VL鏈之序列顯示於表4中。

表3. 呈hG1DE形式之排名最靠前的四種人類化變異體之表徵的概述

					可開發性評估研究							
					Snapshot PK型態					熱處理		
Ab名稱	**VH人類化%**	**VL人類化%**	**結合至DX002，EC50 (nM)**	**CD16接合，EC50 (nM)**	**1h ug/ml**	**24h ug/ml**	**96h ug/ml**	**調配物**	**cIEF**	**25°C**	**40°C**	**在低pH值下之應力(6 h)**	**冷凍/解凍(5x)**
HFB2-4hG1				**0.010**	146	52	43						
HFB2-4hG1DE			0,186		138	39	20						
HFB2-4hz37hG1DE	87,4%	80,6%	0,099	0.010	151	30	14	乙酸鹽	9,10 +++	穩定	降解	降解	穩定
HFB2-4hz38hG1DE		83,0%	0,106	0.010	161	37	17	乙酸鹽	8,80 ++	降解	降解	降解	穩定
HFB2-4hz39hG1DE	85,4%	81,0%	0,260	0.011	90	20	7	乙酸鹽	9,35 ++	穩定	降解	降解	穩定
HFB2-4hz42hG1DE	88,5%	81,0%	0,171	0.009	126	37	16	乙酸鹽	9,15 +++	穩定	降解	穩定	穩定
			類似		**Hz38、Hz42、Hz37**					**Hz37、Hz39、Hz42**		**Hz42**	**類似**

表4. 來自基於HFB2-4hG1之其他系列之抗體之先導抗體的VH及VL序列

	Ab名稱	HC名稱	LC名稱	可變HC胺基酸	可變LC胺基酸
	HFB2-4hG1(VH+VL)			QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSGLISRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQSDDTATYYCARVVYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGKAPKLLIYRMSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 109)
HFB2-4hz37hG1	HFB2-VH3VL6	pHFB-HFB2-**VH3**	pHFB-HFB2-**VL6**	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)
HFB2-4hz42hG1	HFB2-VH10VL6	pHFB-HFB2-**VH10**	pHFB-HFB2-**VL6**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGVIWGDGSTNYAQKLQGRVTMTKDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 113)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSKSLLHSNGKTYLYWFQQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSVQSEDVAVYYCMQHLEYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 112)

*CDR序列加雙下劃線。

實例6　非海藻糖基化抗CXCR5抗體之產生及表徵

【0466】　產生用於增加與FcγRIIIa之結合且增強抗體效應功能之HFB2-4hG1及HFB2-4hz42-hG1之非海藻糖基化模式，用於使用類似於先前所描述之分析進行測試。結果概述如下。

【0467】　非海藻糖基化HFB2-4hG1 (afu-HFB2-4hG1)及HFB2-4hz42-hG1 (afu-HFB2-4hz42-hG1)以亞nM親合力結合至DX002細胞上之人類CXCR5且展示彼此類似之結合型態。參見圖24A。

【0468】　藉由ADCC報告子分析確定之CD16接合亦表明afu-HFB2-4hz42-hG1展示類似於afu-HFB2-4hG1親本抗體之接合CD16之效能。參見圖24B。

【0469】　另外，NK細胞通過由afu-HFB2-4hz42-hG1誘導之ADCC活體外殺死Raji細胞(資料未顯示)及自健康供體分離之B細胞(圖25)類似於基準抗體。關於表現CXCR5之T濾泡輔助細胞(Tfh)之ADCC殺傷作用的初始資料亦表明afu-HFB2-4hz42-hG1亦可誘導NK介導之自人類分離之CD4+CXCR5+原代T細胞之溶解(資料未顯示)。

【0470】　使用非海藻糖基化抗體檢驗NK對來自SS患者之B細胞之殺傷作用。如圖26中所示，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1以類似於基準抗體之程度誘導B細胞溶解。

【0471】　此外，針對補體依賴性細胞毒性(CDC)對非海藻糖基化抗體進行測試。使用已知具有CDC活性之利妥昔單抗(hIgG1模式)作為陽性對照。使用血清來提供實驗中補體系統之組分。利妥昔單抗在100 nM下達至約70-80%細胞溶解，但在非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1及非海藻糖基化HFB2-4hG1中未觀測到CDC活性。參見圖27A-27B。

【0472】　在野生型小鼠及食蟹猴中檢驗非海藻糖基化抗體之藥物動力學。在野生型C57BL/6J小鼠中，以10 mg/kg劑量以單次劑量由尾部靜脈注射非海藻糖

基化HFB2-4hz42-hG1、HFB2-4hG1及基準抗體，且在注射後0.5、6、24、96及168小時收集血漿以測定抗體濃度。afu-HFB2-4hz42-hG1之半衰期為114小時，PK型態類似於親本及基準抗體。參見圖28A。

【0473】 在食蟹猴(1雄性、2雌性)中，靜脈內輸注1mg/kg之單次劑量之抗體，且在注射之後2週期間對血液中之抗體濃度進行測定。在所測試之猴中，afu-HFB2-4hz42-hG1具有3-6.5天之半衰期。參見圖28B。

【0474】 使非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1經受多個穩定性測試：在25℃及40℃下熱處理長達30天，在3.5之低pH值下經受應力長達6小時，及多達5個冷凍/解凍循環。結果表明，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1在此等測試條件下總體上為穩定的(資料未顯示)。

【0475】 總體來說，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1針對來自健康供體與SS患者之原代B細胞類似於親本抗體在pM濃度下展現極大之結合及活體外ADCC活性，不誘導補體依賴性細胞毒性，展示有利藥物動力學型態及高穩定性。因此，非海藻糖基化HFB2-4hz42-hG1具有極大之在臨床治療中使用之潛能。

參考文獻

【0476】 本文論述之所有參考文獻以引用之方式併入本文中。

Förster R, Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production, J Exp Med. 2000.

Allen CD, Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5, Nat Immunol. 2004.

Förster R, A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen, Cell, 1996.

Reif K, Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position, Nature, 2002.

Aqrawi L, Diminished CXCR5 expression in peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome may relate to both genotype and salivary gland homing. Clinic Exp Immunol, 2018.

Szabo K, The Histopathology of Labial Salivary Glands in Primary Sjögren's Syndrome: Focusing on Follicular Helper T Cells in the Inflammatory Infiltrates, Mediators Inflamm. 2014.

Kramer JM , CXCL13 is elevated in Sjögren's syndrome in mice and humans and is implicated in disease pathogenesis, J Leukoc Biol, 2013.

Sharma A, Early BAFF receptor blockade mitigates murine Sjögren's syndrome: Concomitant targeting of CXCL13 and the BAFF receptor prevents salivary hypofunction, Clin Immunol, 2016.

Moser B, CXCR5, the defining marker for follicular B helper T (TFH) cells, Front. Immunol, 2015.

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體或其抗原結合片段對人類CXCR5具特異性，且其中該單株抗體包含：

(1) 重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區包含VH CDR1序列、VH CDR2序列及VH CDR3序列；其中該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；視情況，該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含在表A、表B及表D中之任一單株抗體之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列；及/或

(2) 輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區包含VL CDR1序列、VL CDR2序列及VL CDR3序列；其中該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VLCDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列；視情況，該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含在表A、表C及表D中之任一單株抗體之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。

【請求項2】 如請求項1之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中：

(1) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 1、2及3之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 9、10及11之胺基酸序列；

(2) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 17、18及19之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 25、26及27之胺基酸序列；

(3) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、34及35之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序

列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 41、42及43之胺基酸序列；

(4) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列；

(5) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及65之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列；

(6) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 69、70及71之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 76、77及78之胺基酸序列；

(7) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 33、49及51之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 149、150及151之胺基酸序列；或

(8) 該VH CDR1序列、該VH CDR2序列及該VH CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 114、115及116之胺基酸序列，且該VL CDR1序列、該VL CDR2序列及該VL CDR3序列分別包含SEQ ID NO: 120、121及122之胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體為小鼠-人類嵌合抗體，該小鼠-人類嵌合抗體包含人類抗體(諸如hIgG1、hIgG2、hIgG3或hIgG4)之恆定區序列，其中該VH序列為SEQ ID NO: 8、24、40、56、165或75中之任一者或與SEQ ID NO: 8、24、40、56、165或75之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，及/或其中該VL序列為SEQ ID

NO: 16、32、48、63、68或83中之任一者或與SEQ ID NO: 16、32、48、63、68或83之胺基酸序列中之任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【請求項4】 如請求項3之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中：

(1) 該VH序列為SEQ ID NO: 8或與SEQ ID NO: 8具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 16或與SEQ ID NO: 16具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(2) 該VH序列為SEQ ID NO: 24或與SEQ ID NO: 24具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 32或與SEQ ID NO: 32具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(3) 該VH序列為SEQ ID NO: 40或與SEQ ID NO: 40具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 48或與SEQ ID NO: 48具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(4) 該VH序列為SEQ ID NO: 56或與SEQ ID NO: 56具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 63或與SEQ ID NO: 63具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；

(5) 該VH序列為SEQ ID NO: 165或與SEQ ID NO: 165具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 68或與SEQ ID NO: 68具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性；或

(6) 該VH序列為SEQ ID NO: 75或與SEQ ID NO: 75具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且該VL序列為SEQ ID NO: 83或與SEQ ID NO: 83具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。

【請求項5】 如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該單株抗體為人類化抗體，視情況，該人類化抗體包含：

(1) 表B、表D及表E中之任一單株抗體之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列；及/或表C、表D及表E中之任一單株抗體之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(2) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(3) SEQ ID NO: 113之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 112之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(4) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 101之VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列；

(5) SEQ ID NO: 96之VH序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列，及SEQ ID NO: 109之

VL序列或與其至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VL序列。

【請求項6】 如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該人類化抗體包含：

(1) VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4，該VH構架區序列VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4：

(i) 屬於表B及表D中之任一抗體，

(ii) 分別包含與SEQ ID NO: 84、85、86及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(iii) 分別包含與SEQ ID NO: 89、90、91及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或

(iv) 分別包含與SEQ ID NO: 93、94、95及87實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(v) 分別包含與SEQ ID NO: 132、85、110及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(vi) 分別包含與SEQ ID NO: 93、126、127及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(vii) 分別包含與SEQ ID NO: 132、133、134及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列

一致性)或一致之胺基酸序列；

(viii) 分別包含與SEQ ID NO: 138、94、139及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或

(ix) 分別包含與SEQ ID NO: 141、142、143及87之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；及/或

(2) VL構架區序列VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4，該VL構架區序列VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4：

(i) 屬於表C及表D中之任一抗體，

(ii) 分別包含與SEQ ID NO: 97、98、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(iii) 分別包含與SEQ ID NO: 97、102、99及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(iv) 分別包含與SEQ ID NO: 103、104、105及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(v) 分別包含與SEQ ID NO: 103、107、108及100實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(vi) 分別包含與SEQ ID NO: 50、135、136及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列

一致性)或一致之胺基酸序列；

(vii) 分別包含與SEQ ID NO: 128、129、130及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(viii) 分別包含與SEQ ID NO: 145、146、147及131之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；

(ix) 分別包含與SEQ ID NO: 97、98、152及100之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列；或

(x) 分別包含與SEQ ID NO: 154、102、99及47之胺基酸序列實質上一致(例如具有至少約80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列一致性)或一致之胺基酸序列。

【請求項7】 如請求項6之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中：

(1) 該VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4序列分別包含

(i) SEQ ID NO: 93、94、95及87；

(ii) SEQ ID NO: 132、85、110及87；

(iii) SEQ ID NO: 93、126、127及87；或

(iv) SEQ ID NO: 132、133、134及87；及/或

(2) 該VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4序列分別包含

(i) SEQ ID NO: 50、135、136及131；或

(ii) SEQ ID NO: 128、129、130及131。

【請求項8】 如請求項7之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中

(1) 該VH序列包含SEQ ID NO: 96之胺基酸序列且該VL序列包含SEQ ID

NO: 112之胺基酸序列；或

(2) 該VH序列包含SEQ ID NO: 113之胺基酸序列且該VL序列包含SEQ ID NO: 112之胺基酸序列。

【請求項9】 如請求項1或2之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該VH序列包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列且VL序列包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列。

【請求項10】 如請求項1-9中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其包含經修飾之Fc區以增強ADCC。

【請求項11】 如請求項10之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該經修飾之Fc區包含：

(1) F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L突變以增強FcγRIIIa結合；

(2) S239D/I332E突變以增強FcγRIIIa結合；

(3) S239D/I332E/A330L突變以同時增強FcγRIIIa結合且降低FcγRIIIb結合；

(4) S298A/E333A/K334A突變以增強FcγRIIIa結合；及/或

(5) Fc區之非海藻糖基化N297以增強FcγRIIIa結合。

【請求項12】 如請求項1-9中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其中該其抗原結合片段為Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F_v、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、$IgG\Delta CH_2$、微型抗體、$F(ab')_3$、四抗體、三抗體、雙抗體、單結構域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

【請求項13】 如請求項1-12中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其ADCC活性具有低(例如1-5或1-2) pM範圍EC50值。

【請求項14】 如請求項1-13中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，

其針對表現表面hCXCR5之原代B細胞及/或表現表面hCXCR5之原代T細胞具有ADCC活性。

【請求項15】 如請求項1-14中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其不(或至多最低限度地)內化hCXCR5表面抗原。

【請求項16】 如請求項1-15中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其抑制cAMP信號傳導(例如EC50小於1 nM)。

【請求項17】 如請求項1-16中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其抑制趨化性(例如在約0.1-0.5 nM或約0.1 nM下具有約100%抑制)。

【請求項18】 如請求項1-17中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其抑制hCXCL13誘導之B細胞遷移。

【請求項19】 如請求項1-18中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其實質上不與hCXCR3交叉反應。

【請求項20】 如請求項1-19中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其結合至黏附細胞株(諸如DX002)及/或懸浮細胞株(諸如M300-19)上所表現之hCXCR5。

【請求項21】 如請求項1-20中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其不與或最低限度地與hCXCR5之食蟹猴或小鼠異種同源物交叉反應。

【請求項22】 如請求項1-21中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其降低個體中記憶B細胞群體之百分比。

【請求項23】 如請求項1-22中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段，其以小於約25 nM、20 nM、15 nM、10 nM、5 nM、2 nM或1 nM或更小之K_d結合hCXCR5。

【請求項24】 一種分離之單株抗體或其抗原結合片段，其與如請求項1-23中任一項之分離之單株抗體或其抗原結合片段競爭結合至相同抗原決定基。

【請求項25】 一種治療有需要之個體之休格蘭症候群(Sjögren syndrome，SS)的方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體。

【請求項26】 如請求項25之方法，其緩解SS之至少一種症狀。

【請求項27】 一種治療有需要之個體之具有異位生髮中心(GC)之疾病或適應症之方法，該疾病或適應症包括自體免疫疾病或病症，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體。

【請求項28】 如請求項27之方法，其中該疾病或適應症為類風濕性關節炎(RA)、系統性紅斑狼瘡(SLE)、乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、I型糖尿病、多發性硬化(MS)、類肉瘤病、銀屑病、重症肌無力、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyrioiditis)、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、動脈硬化、結膜炎、胃炎、肝炎或皮炎。

【請求項29】 一種治療有需要之個體之淋巴瘤或白血病的方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體。

【請求項30】 如請求項29之方法，其中該淋巴瘤或白血病為B細胞淋巴瘤。

【請求項31】 如請求項30之方法，其中該B細胞淋巴瘤為CLL (B細胞慢性淋巴細胞性白血病)。

【請求項32】 如請求項30之方法，其中該淋巴瘤或白血病為非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)，諸如伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)。

【請求項33】 一種治療有需要之個體之實體癌症的方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1-24中任一項之抗體，其中該實體癌症為胃癌、乳癌、腸癌、肺癌或前列腺癌。

【請求項34】 如請求項29-33中任一項之方法，其進一步包括向患者投與化學治療劑、抗血管生成劑、生長抑制劑、免疫腫瘤劑及/或抗贅生組合物。

【請求項35】 一種聚核苷酸，其編碼如請求項1-24中任一項之重鏈或輕鏈或其抗原結合部分。

【請求項36】 如請求項35之聚核苷酸，其經密碼子優化以便在人類細胞中表現。

【請求項37】 一種載體，其包含如請求項35或36之聚核苷酸。

【請求項38】 如請求項37之載體，其為表現載體(例如哺乳動物表現載體、酵母表現載體、昆蟲表現載體或細菌表現載體)。