



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102421800 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 18

(21) 申请号 201080017754. 8

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(22) 申请日 2010. 02. 23

11247

代理人 史文静 黄革生

(30) 优先权数据

61/154, 524 2009. 02. 23 US

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 10. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2010/000353 2010. 02. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02010/095031 EN 2010. 08. 26

(83) 生物保藏信息

DSM 23302 2010. 02. 05

DSM 23303 2010. 02. 05

(71) 申请人 格兰马克药品股份有限公司

地址 瑞士拉绍德封

(72) 发明人 S·布莱恩 D·斯凯戈罗

C·达博纳维尔 M·博特施格罗

权利要求书 8 页 说明书 69 页

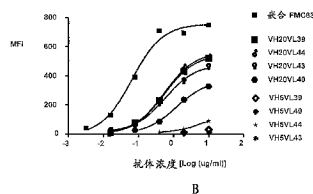
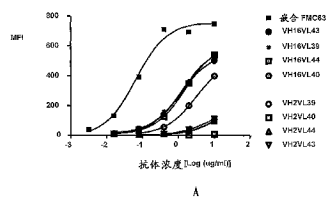
序列表 96 页 附图 13 页

(54) 发明名称

结合 CD19 的人源化抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及结合人 CD19 的人源化抗体或其片段。更具体而言,本发明涉及结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包括包含 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。



1. 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包括包含 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

2. 权利要求 1 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的重链 CDR1,包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3。

3. 权利要求 1 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,包含 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。。

4. 权利要求 1 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的重链 CDR1,包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;以及包括包含 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,包含 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

5. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :19、20、21、22 和 42 的重链可变区序列。

6. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括与 SEQ ID NO :19、20、21、22 或 42 的框架区序列至少 80% 相同的重链可变框架区序列。

7. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括 SEQ ID NO :21 的重链可变区序列。

8. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括与 SEQ ID NO :21 的框架区序列至少 80% 相同的重链可变框架区序列。

9. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括这样的重链可变框架区,所述重链可变框架区是选自 V3-33 * 01 (SEQ ID NO :11)、V3-11 * 01 (SEQ ID NO :12)、V3-30 * -18 (SEQ ID NO :13) 和 V3-48 * 01 (SEQ ID NO :14) 的人基因的产物或源自所述人基因。

10. 权利要求 1 至 9 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段的至少一个重链 CDR 包含至少一种氨基酸修饰。

11. 权利要求 10 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在重链 CDR1 内的氨基酸取代 Y32F,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示氨基酸位置。

12. 权利要求 10 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在重链 CDR2 内的氨基酸取代 Y58F 或 Y59F,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

13. 权利要求 10 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在重链 CDR3 内的选自 Y96F、Y97F、Y98F 和 Y100BF 的一个或多个氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

14. 权利要求 5 至 13 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段的至少一个框架区包含至少一种氨基酸修饰,所述氨基酸修饰来自相应的鼠

抗体的重链可变区的相应的框架区。

15. 权利要求 14 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在选自 37、42、48、49、67、71、78 和 94 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

16. 权利要求 14 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在选自 42、67、71、78 和 94 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

17. 权利要求 14 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自 G42R、F67L、R71K、L78V 和 R94K 的氨基酸取代,条件是如果氨基酸修饰是 R94K,则重链可变区序列不是 SEQ ID NO :19 或 SEQ ID NO :20,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

18. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :23、24、25、26 和 41 的轻链可变区序列。

19. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括与 SEQ ID NO :23、24、25、26 和 41 的框架区序列至少 80% 相同的轻链可变框架区序列。

20. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括 SEQ ID NO :41 的轻链可变区序列。

21. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括与 SEQ ID NO :41 的框架区序列至少 80% 相同的轻链可变框架区序列。

22. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括这样的轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是选自 V1-5 * 03 (SEQ ID NO :3)、V1-27 * 01 (SEQ ID NO :4)、V1-39 * -01 (SEQ ID NO :5) 和 V1-12 * 01 (SEQ ID NO :6) 的人基因的产物或源自所述人基因。

23. 权利要求 1 至 4 或 18 至 22 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段的至少一个轻链 CDR 包括至少一种氨基酸修饰。

24. 权利要求 23 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在轻链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

25. 权利要求 23 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自轻链 CDR3 内的 N92A、T93A 和 T93V 的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

26. 权利要求 18 至 25 的任一项的人源化抗体或其片段,其中人源化抗体或其片段的轻链可变区的至少一个框架区包括至少一种氨基酸修饰,所述氨基酸修饰来自相应鼠抗体的轻链可变区的相应框架区。

27. 权利要求 26 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在选自 44、71 和 87 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

28. 权利要求 26 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自 P44V、P44I、P44L、F71Y、F71H、F71S、F71T 和 Y87F 的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

29. 权利要求 26 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自 P44V、P44I、F71Y

和 Y87F 的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

30. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 选自 SEQ ID NO :19、20、21、22 和 42 的重链可变区序列 ;和
- (b) 选自 SEQ ID NO :23、24、25、26 和 41 的轻链可变区序列。

31. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列的重链可变区序列 ;和
- (b) 包含 SEQ ID NO :41 的氨基酸序列的轻链可变区序列。

32. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :33、34、35、36、37、43、44、45、46、47、54 和 55 的重链可变区。

33. 权利要求 1 至 4 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :25、38、39、40、48、49、50、51、52、53、56、57、58、59、60、61、62 和 63 的轻链可变区。

34. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区。

35. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :60 的氨基酸序列的轻链可变区。

36. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区。

37. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :25 的氨基酸序列的轻链可变区。

38. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :49 的氨基酸序列的轻链可变区。

39. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :49 的氨基酸序列的轻链可变区。

40. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :43 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区。

41. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :64 的氨基酸序列的重链序列 ;和
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

42. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列 ;和
- (b) 包含 SEQ ID NO :67 的氨基酸序列的轻链序列。

43. 权利要求 4 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列 ;和
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

44. 权利要求 1 至 40 的任一项的人源化抗体或其片段,其还包括人重链和 / 或轻链恒定区。

45. 权利要求 44 的人源化抗体或其片段,其中所述人重链恒定区选自由 IgG1、IgG2、

IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgD 和 IgE 组成的人免疫球蛋白的组。

46. 权利要求 44 的人源化抗体或其片段,其中所述人重链恒定区是人 IgG。

47. 权利要求 44 的人源化抗体或其片段,其中所述人重链恒定区是人 IgG1。

48. 权利要求 44 的人源化抗体或其片段,其中所述人重链恒定区包括包含来自人 IgG1 的 CH1、来自人 IgG1 的铰链区和来自人 IgG3 的 Fc 区的同种型变体。

49. 权利要求 48 的人源化抗体或其片段,其包括:

(a) 包含 SEQ ID NO:124 的氨基酸序列的重链序列;和

(b) 包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列。

50. 权利要求 48 的人源化抗体或其片段,其中所述同种型变体相比权利要求 47 的人源化抗体或其片段表现出改善的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

51. 权利要求 44 的人源化抗体或其片段,其中所述人轻链恒定区选自由人 κ 和人 λ 组成的人免疫球蛋白的组。

52. 权利要求 51 的人源化抗体或其片段,其中所述人轻链恒定区是人 κ 。

53. 权利要求 1 至 52 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述抗体是全长抗体。

54. 权利要求 1 至 52 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述抗体是抗体片段,其选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')₂、scFv、双特异性单链 Fv 二聚体、双抗体、三链抗体和与相同或不同抗体遗传融合的 scFv。

55. 权利要求 1 至 53 的任一项的人源化抗体或其片段,其中所述抗体包括相对于亲本抗体的人 IgG Fc 区含有至少一种氨基酸修饰的变体人 IgG Fc 区,而包含变体人 IgG Fc 区的抗体表现出相比亲本抗体改变的效应子功能。

56. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段,其中所述效应子功能是补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和 / 或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

57. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段,其中所述氨基酸修饰包括在选自 269、274、276、298、324 和 334 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

58. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段,其中所述氨基酸修饰包括选自 E269D、K274Q、N276K、S298A、S324N 和 K334R 的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

59. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段,其中所述氨基酸修饰包括在选自 269/274、269/276、269/298、269/324、269/334、274/276、274/298、274/324、274/334、276/298、276/324、276/334、298/324、298/334、324/334、269/274/276、269/274/298、269/274/324、269/274/334、269/276/298、269/276/324、269/276/334、269/298/324、269/298/334、274/276/298、274/276/324、274/276/334、274/298/324、274/298/334、276/298/324、和 276/298/334 的氨基酸位置上的氨基酸取代的组合,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

60. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段,其中所述氨基酸修饰包括选自 E269D/K274Q、E269D/N276K、E269D/S298A、E269D/S324N、E269D/K334R、K274Q/N276K、K274Q/S298A、K274Q/S324N、K274Q/K334R、N276K/S298A、N276K/S324N、N276K/K334R、S298A/S324N、S298A/K334R、S324N/K334R、E269D/K274Q/N276K、E269D/K274Q/S298A、E269D/K274Q/

S324N, E269D/K274Q/K334R, E269D/N276K/S298A, E269D/N276K/S324N, E269D/N276K/K334R, E269D/S298A/S324N, E269D/S298A/K334R, K274Q/N276K/S298A, K274Q/N276K/S324N, K274Q/N276K/K334R, K274Q/S298A/S324N, K274Q/S298A/K334R, N276K/S298A/S324N, 和 N276K/S298A/K334R 的氨基酸取代的组合, 其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每组成员的氨基酸位置。

61. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :114 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

62. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :115 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

63. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :116 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

64. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :117 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

65. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :118 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

66. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :119 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

67. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :120 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

68. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :121 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

69. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :122 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

70. 权利要求 55 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段包括

- (a) 包含 SEQ ID NO :123 的氨基酸序列的重链序列;
- (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

71. 权利要求 46 的人源化抗体或其片段, 其中所述与人 IgG Fc 区连接的成熟的核心糖类结构缺少岩藻糖。

72. 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其中所述抗体包括变体人 IgG Fc 区, 所述变体人 IgG Fc 区包含用天冬酰胺替换亲本抗体的氨基酸 324 位的丝氨酸的氨基酸取代

S324N, 而包括所述变体人 IgG Fc 区的抗体相比亲本抗体表现出改善的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

73. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段结合 Raji 肿瘤细胞, 其具有的中点荧光 (MPF) 相对于相应嵌合抗体的结合为至少 10%。

74. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段结合人 CD19, 其具有的亲和力 (K_d) 为 50nM 或更低。

75. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段保留了相应嵌合抗体的至少 20% 的 CD19 结合亲和力 (K_d)。

76. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体竞争结合 Raji 肿瘤细胞, 其具有的亲和力 (K_i) 为 50nM 或更低。

77. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段在 Raji 肿瘤细胞中诱导凋亡。

78. 权利要求 77 的人源化抗体或其片段, 其中在至少 10% 的 Raji 肿瘤细胞中诱导凋亡。

79. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段在 Raji 肿瘤细胞中诱导 ADCC 活性。

80. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段抑制恶性 B 细胞的增殖。

81. 权利要求 80 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段保留了相应嵌合抗体的至少 60% 的对恶性 B 细胞增殖的抑制。

82. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段抑制 Raji 肿瘤细胞的克隆发生。

83. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段导致血液中的 B 细胞耗尽。

84. 权利要求 83 的人源化抗体或其片段, 其中所导致的 B 细胞耗尽至少与相应嵌合抗体导致的 B 细胞耗尽相同。

85. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体或其片段在 Raji 肿瘤细胞中内化。

86. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体具有大于 65°C 的 FAB 片段热稳定温度。

87. 权利要求 86 的人源化抗体或其片段, 其中所述人源化抗体的 FAB 片段的热稳定温度等于亲本鼠抗体的 FAB 片段的热稳定温度。

88. 编码权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段的分离的核酸。

89. 分离的核酸, 其包括结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的重链编码核酸序列, 所述重链编码核酸序列保藏在 DSMZ 的具有登录号 DSM 23302 的微生物中。

90. 分离的核酸, 其包括结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的轻链编码核酸序列, 所述轻链编码核酸序列保藏在 DSMZ 的具有登录号 DSM 23303 的微生物中。

91. 载体, 其包括权利要求 88 的分离的核酸或权利要求 89 和 90 的分离的核酸。

92. 宿主细胞, 其包括权利要求 88 的分离的核酸或权利要求 89 和 90 的分离的核酸或

权利要求 91 的载体。

93. 生产结合人 CD19 的人源化抗体或其片段的方法,其包括培养权利要求 92 的宿主细胞,使得表达核酸和生产抗体。

94. 权利要求 89 和 90 的分离的核酸编码的结合人 CD19 的人源化抗体或其片段。

95. 组合物,其包括权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段,和药学可接受的载体。

96. 免疫缀合物,其包括与治疗剂连接的权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段。

97. 组合物,其包括权利要求 96 的免疫缀合物,和药学可接受的载体。

98. 抑制表达 CD19 的肿瘤细胞生长的方法,其包括将细胞与一定量的权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段接触,所述量有效的抑制肿瘤细胞的生长。

99. 权利要求 98 的方法,其中所述肿瘤细胞选自人伯基特淋巴瘤细胞、人 B 细胞前体型白血病细胞、人 B 细胞白血病细胞或人 B 细胞型淋巴瘤细胞。

100. 耗尽对象中的 B 细胞的方法,其包括向对象施用一定量的权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段,所述量有效的耗尽对象中的 B 细胞。

101. 治疗对象中 CD19 介导的病症的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段。

102. 权利要求 101 的方法,其中所述 CD19 介导的病症选自包含类风湿性关节炎的自身免疫病症,癌症、非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、多毛细胞白血病、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、皮肤 T- 细胞淋巴瘤、结节性小裂细胞淋巴瘤、外周 T- 细胞性淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、T- 细胞白血病 / 淋巴瘤 (ATLL)、成人 T- 细胞白血病 (T-ALL)、内分芽型 / 中心细胞性 (cb/cc) 滤泡型淋巴瘤癌症、B 系弥漫性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞淋巴瘤 (AILD) - 样 T 细胞性淋巴瘤、HIV 相关性体腔淋巴瘤、胚性癌、鼻咽部的未分化癌 (例如,施明克瘤)、卡斯尔曼病、卡波氏肉瘤、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症、抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症和其他的 B 细胞淋巴瘤和白血病。

103. 权利要求 101 的方法,其中所述 CD19 介导的病症选自非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、多毛细胞白血病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE) 和抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症。

104. 权利要求 101 的方法,其中所述 CD19 介导的病症是肿瘤发生性病症。

105. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段作为药物的用途。

106. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段在制备用于治疗 CD19 介导的病症的药物中的用途。

107. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段,其用作为药物。

108. 权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段,其用于治疗 CD19 介导的病症的方法中。

109. 制品,其包括权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段、权利要求 95 或 97 的组合物或权利要求 96 的免疫缀合物,用于治疗 CD19 介导的病症。

110. 药盒,其包括权利要求 1 至 72 的任一项的人源化抗体或其片段、权利要求 95 或

97 的组合物或权利要求 96 的免疫缀合物,用于治疗 CD19 介导的病症。

结合 CD19 的人源化抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及结合人 CD19 的人源化抗体或其片段。更具体而言,本发明涉及结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包括包含 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0002] 发明背景

[0003] B 细胞表面标志物一般被建议作为治疗 B 细胞病症或疾病、自身免疫病和移植排斥的靶。B 细胞表面标志物的实例包括 CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85 和 CD86 白细胞表面标志物。已开发了特异性结合某些这类标志物的抗体,且测试了其中一些用于治疗疾病和病症。

[0004] 例如,针对成熟 B 细胞及其恶性对应物的特异性 CD20 细胞表面分子的嵌合或放射性标记的单克隆抗体 (mAb) 疗法,表现出在体内有效治疗非霍奇金淋巴瘤 (Tedder 等人, *Immunol. Today* 15 :450-454(1994) ;Press 等人, *Hematology*, 221-240(2001) ;Kaminski 等人, *N. Engl. J. Med.* , 329 :459-465(1993) ;Weiner, *Semin. Oncol*, 26 :43-51(1999) ;Onrust 等人, *Drugs*, 58 :79-88(1999) ;McLaughlin 等人, *Oncology*, 12 :1763-1769(1998) ;Reff 等人, *Blood*, 83 :435-445(1994) ;Maloney 等人, *Blood*, 90 :2188-2195(1997) ;Maloney 等人, *J. Clin. Oncol*, 15 :3266-3274(1997) ;Anderson 等人, *Biochem. Soc. Transac*, 25 :705-708(1997))。还发现抗 CD20 单克隆抗体疗法缓解了类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、特发性血小板减少性紫癜和溶血性贫血,以及其他免疫介导性疾病的表现 (Silverman 等人, *Arthritis Rheum.* , 48 :1484-1492(2002) ;Edwards 等人, *Rheumatology*, 40 :1-7(2001) ;De Vita 等人, *Arthritis Rheumatism*, 46 :2029-2033(2002) ;Leandro 等人, *Ann. Rheum. Dis.* , 61 :883-888(2002) ;Leandro 等人, *Arthritis Rheum.* , 46 :2673-2677(2001))。抗 CD20 单克隆抗体 LL-2 表现出有效治疗经历化疗治疗的进行性和复发性淋巴瘤患者 (Goldenberg 美国专利号 6, 134, 982 和 6, 306, 393)。抗 CD20 (IgG1) 抗体 RITUXAN(TM) 成功的用于治疗某些疾病,例如成人免疫血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎和自身免疫性溶血性贫血 (Cured 等人, WO 00/67796)。尽管该疗法有效,但大部分的急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和许多其他的 B 细胞恶性肿瘤不表达 CD20, 或者以低水平表达 CD20, 或者在 CD20 免疫疗法后丢失了 CD20 表达 (Smith 等人, *Oncogene*, 22 :7359-7368(2003))。此外,CD20 的表达不能预测对抗 CD20 疗法的响应,因为仅一半的非霍奇金淋巴瘤患者响应针对 CD20 的免疫疗法。

[0005] 人 CD19 分子是在人 B 细胞的表面上表达的结构上不同的细胞表面受体,所述 B 细胞包括但不限于前 B 细胞、处于早期发育中的 B 细胞 (即,未成熟 B 细胞)、经过终末分化为浆细胞的成熟 B 细胞,和恶性 B 细胞。大部分的前 B 细胞急性淋巴细胞白血病 (ALL)、非霍奇金淋巴瘤、B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、原淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、

普通急性淋巴细胞白血病和一些 Null- 急性淋巴细胞白血病都表达 CD19 (Nadler 等人, *J. Immunol.*, 131 :244-250 (1983) ;Loken 等人, *Blood*, 70 :1316-1324 (1987) ;Uckun 等人, *Blood*, 71 :13-29 (1988) ;Anderson 等人, 1984. *Blood*, 63 :1424-1433 (1984) ;Scheuermann, *Leuk. Lymphoma*, 18 :385-397 (1995))。CD19 在浆细胞上的表达进一步提示,它可能在分化的 B 细胞肿瘤上表达,例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、Waldenstrom 肿瘤 (Grossbard 等人, *Br. J. Haematol.*, 102 :509-15 (1998) ;Treon 等人, *Semin. Oncol.*, 30 :248-52 (2003))。

[0006] CD19 抗原也是免疫疗法的多个假定靶之一。CLB-CD 19 抗体 (抗 CD19 鼠 IgG2a mAb) 表现出抑制移植到无胸腺小鼠中的人肿瘤的生长 (Hooijberg 等人, *Cancer Research*, 55 :840-846 (1995))。在另一项研究中,使用人 IgG1Fc 区嵌合单克隆鼠抗体 FMC63 (IgG2a) (Zola 等人, *Immunol Cell Biol* 69 :411-22 (1991))。该抗体不在体外诱导补体介导的细胞毒性或 ADCC,其施用到有人 B 细胞淋巴瘤的 SCID 小鼠 (异种移植模型) 中导致中等但非特异性的杀伤所移植的肿瘤细胞 (Pietersz 等人, *Cancer Immunol. Immunother.*, 41 :53-60 (1995))。

[0007] 使用植入肿瘤的异种移植小鼠模型获得的结果导致在人类患者中使用鼠抗 CD19 抗体的研究。将鼠 CLB-CD 19 抗体施用到 6 位诊断为进行性非霍奇金淋巴瘤的患者中,上述患者未能在之前用常规疗法 (化疗或放疗) 成功治疗。给予这些患者的总抗体剂量是从 225 至 1000mg (Hekman 等人, *Cancer Immunol. Immunotherapy*, 32 :364-372 (1991))。虽然在抗体注入后,两名患者的循环肿瘤细胞暂时降低了,但是在两个阶段的抗体治疗后,仅 1 名患者实现了部分减轻。从该小组复发型患者中不能得出关于治功效果的任何结论。

[0008] 之后,这些研究人员展示了在移植模型中,未缀合的 CD20mAb 的抗肿瘤效应远高于 CD 19mAb 的 (Hooijberg 等人, *Cancer Res.*, 55 :840-846 (1995) ;和 Hooijberg 等人, *Cancer Res.*, 55 :2627-2634 (1995))。此外,他们未观察到当组合使用 CD19 和 CD20mAb 时的增益或协同效应 (Hooijberg 等人, *Cancer Res.*, 55 :840-846 (1995))。虽然异种移植动物模型被视为是对人类对象的功效的不充分的预后指示物,但是在上述动物研究中获得的消极结果打消了对裸露的抗 CD19 抗体疗法的兴趣。

[0009] 基于抗 CD19 抗体的免疫毒素的应用产生了同样令人失望的结果。在早期临床试验中,将 B4 抗 CD19 抗体 (鼠 IgG1mAb) 与植物毒素蓖麻毒蛋白缀合,施用给之前在常规疗法中失败的患多发性骨髓瘤 (Grossbard 等人, *British Journal of Haematology*, 102 :509-515 (1998))、高等非霍奇金淋巴瘤 (advanced non-Hodgkin's lymphoma) (Grossbard 等人, *Clinical Cancer Research*, 5 :2392-2398 (1999)), 和复发性 B 细胞恶性肿瘤 (Grossbard 等人, *Blood*, 79 :576-585 (1992)) 的人类患者。这些试验一般性的证实了向人类施用 B4- 蓖麻毒蛋白缀合物的安全性;然而,相比 RITUXAN(TM) 的临床试验 (Grossbard 等人, *Clinical Cancer Research*, 5 :2392-2398 (1999)), 结果是混杂的,而响应速率则令人失望。此外,显著一部分的患者出现了人抗小鼠抗体 (HAMA) 响应或人抗蓖麻毒蛋白抗体 (HARA) 响应。

[0010] 考虑到使用裸露的抗 CD19 抗体或基于抗 CD19 抗体的免疫毒素的现有疗法产生同样令人失望的结果,需要开发更有效地治疗 CD19 介导的病症的抗 CD19 抗体,例如,通过触发凋亡和阻断 B 细胞增殖,以及介导通过 ADCC 的杀伤,能够有效诱导肿瘤细胞死亡的抗 CD19 抗体。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明一般涉及结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其制备和使用的方法,包括治疗 CD19 介导的病症的方法。本发明的结合人 CD19 的人源化抗体或其片段表现出多种理想的特性,包括例如 ADCC 活性、诱导凋亡和抑制 B 细胞增殖。

[0013] 在一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3。在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包含 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO :19、20、21、22 和 42 的重链可变区序列。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括这样的重链可变框架区,所述重链可变框架区是选自 V3-33 * 01 (SEQ ID NO :11)、V3-11 * 01 (SEQ ID NO :12)、V3-30 * -18 (SEQ ID NO :13) 和 V3-48 * 01 (SEQ ID NO :14) 的人基因的产物或源自所述人基因。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO :23、24、25、26 和 41 的轻链可变区序列。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括这样的轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是选自 V1-5 * 03 (SEQ ID NO :3)、V1-27 * 01 (SEQ ID NO :4)、V1-39 * -01 (SEQ ID NO :5) 和 V1-12 * 01 (SEQ ID NO :6) 的人基因的产物或源自所述人基因。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO :33、34、35、36、37、43、44、45、46、47、54 和 55 的重链可变区。

[0020] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO :25、38、39、40、48、49、50、51、52、53、56、57、58、59、60、61、62 和 63 的轻链可变区。

[0021] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括 :

[0022] (a) 包含 SEQ ID NO :64 的氨基酸序列的重链序列 ;和

[0023] (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

[0024] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括 :

[0025] (a) 包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列 ;和

[0026] (b) 包含 SEQ ID NO :67 的氨基酸序列的轻链序列。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括 :

[0028] (a) 包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列 ;和

[0029] (b) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括人重(链)和 / 或轻(链)恒定区,其中所述人重(链)恒定区包括同种型变体,所述变体包含人 IgG1 的 CH1、人 IgG1 的铰链区和人 IgG3 的 Fc 区。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的包含变体人 IgG Fc 区的人源化抗体或其片段,其中所述变体人 IgG Fc 区包括相对于亲本抗体的人 IgG Fc 区的至少一个氨基酸修饰,而包含变体人 IgG Fc 区的抗体表现出相比亲本抗体改变的效应子功能。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其中所述抗体包括变体人 IgG Fc 区,所述变体人 IgG Fc 区包含用天冬酰胺替换亲本抗体的氨基酸 324 位的丝氨酸的氨基酸取代 S324N,而包括所述变体人 IgG Fc 区的抗体相比亲本抗体表现出改善的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,所述抗体具有各种理想的特性,例如与 Raji 肿瘤细胞结合、与人 CD19 结合(具有的亲和力 (K_d) 为 50nM 或更低)、保留了相应嵌合抗体的至少 20% 的 CD19 结合亲和力 (K_d)、竞争结合 Raji 肿瘤细胞(具有的亲和力 (K_i) 为 50nM 或更低)、在 Raji 肿瘤细胞中诱导凋亡、在 Raji 肿瘤细胞中的 ADCC 活性、抑制恶性 B 细胞的增殖、抑制 Raji 肿瘤细胞的克隆发生、导致血液中的 B 细胞耗尽、在 Raji 肿瘤细胞中内化和 Fc 片段热稳定温度大于 65°C。

[0034] 本发明还提供了编码结合人 CD19 的人源化抗体及其片段的分离的核酸、载体,和包含所述核酸或载体的宿主细胞。还提供了包含所述人源化抗体或其片段以及药学可接受的载体的组合物,和包括与治疗剂连接的所述人源化抗体或其片段的免疫缀合物。

[0035] 本发明还提供了治疗 CD19 介导的病症的方法、抑制表达 CD19 的肿瘤细胞生长的方法,和在需要此类治疗的对象中耗尽 B 细胞的方法。

[0036] 本发明还提供了药盒和制品,其包括所述人源化抗体或其片段、用于治疗 CD19 介导的病症的组合物或免疫缀合物。

附图简介

[0037] 图 1A 和 1B 显示了流式细胞仪分析,确定移植到人受体抗体框架上的 FMC63-CDR 在 Raji 肿瘤细胞上的结合活性。

[0038] 图 2A 和 2B 显示了 FMC63 的轻链 (A) 或重链 (B) 可变区与选定的 VBASE2 的种系框架和 CDR 移植供体扩增框架的比对。使用 Kabat 编号,并显示在编号行下。

[0039] 图 3 显示了由流式细胞仪所确定的人源化抗体在 SU-DHL-6 人 B 细胞淋巴瘤细胞上的结合活性。

[0040] 图 4A 和 4B 显示了人源化抗 CD19 抗体的 Scatchard 分析曲线。使用钕标记的抗体在 Raji 肿瘤细胞上实施分析。

[0041] 图 5A 和 5B 显示了人源化抗 CD19 抗体对 Raji 肿瘤细胞的 ADCC 活性。

[0042] 图 6 显示了人源化抗 CD19 抗体对 Raji 肿瘤细胞诱导的凋亡。

[0043] 图 7A 显示了人源化抗 CD19 抗体抑制 SU-DHL-6 人 B 细胞淋巴瘤细胞增殖。图 7B 显示了用人源化抗 CD19 抗体治疗后的 Raji 肿瘤细胞的克隆发生。

[0044] 图 8 显示了抗 CD19 抗体在 Raji 肿瘤细胞中的内化。内化受肥皂草毒蛋白缀合的二抗 (Hum-ZAP) 的细胞毒性监控。

[0045] 图 9 显示了与野生型 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 比较, S324 位的抗 CD19 抗体突变体的补体依赖性细胞毒性 (CDC): (1) IgG1 对照抗体;

[0046] (2) VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (3) VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16R94K/S324G-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16R94K/S324A-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16R94K/S324V-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (7) VH16R94K/S324L-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (8) VH16R94K/S324I-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (9) VH16R94K/S324P-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (10) VH16R94K/S324T-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (11) VH16R94K/S324C-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (12) VH16R94K/S324M-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (13) VH16R94K/S324Q-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (14) VH16R94K/S324F-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (15) VH16R94K/S324Y-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (16) VH16R94K/S324W-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (17) VH16R94K/S324R-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (18) VH16R94K/S324D-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (19) 仅血清。

[0047] 图 10 显示了在 E269、S298 和 S324 位上具有取代的抗 CD19 抗体变体的 CDC 测定: (1) 阴性对照——无抗体; (2) IgG1 对照抗体; (3) VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16R94K/S298A/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16R94K/E269D/S298A/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A。

[0048] 图 11 显示了选定的抗 CD19 抗体变体的基于细胞的 ADCC 测定: (1) 阴性对照——无抗体; (2) IgG1 对照抗体; (3) VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16R94K/S298A-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16R94K/E269D/S298A-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A。

[0049] 图 12 显示了选定的抗 CD19 抗体变体的基于细胞的 ADCC 测定: (1) IgG1 对照抗体;

[0050] (2) VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (3) VH16R94K(1133)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16R94K/K274Q-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16R94K/N276K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16R94K/K334R-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (7) VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (8) VH16R94K/K274Q/N276K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (9) VH16R94K/K274Q/N276K/K334R-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (10) 阴性对照——无抗体——无血清; (11) 阴性对照——仅血清。

[0051] 图 13 显示了去岩藻糖基化的抗 CD19 抗体变体的基于细胞的 ADCC 测定: (1) 阴性对照——无抗体; (2) IgG1 对照抗体; (3) VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16R94K(shRNA)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16R94K(GNTIII)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16R94K/E269D/S298A(shRNA)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (7) VH16R94K/E269D/S298A(GNTIII)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A。

[0052] 图 14 显示了在 SCID 小鼠的脾脏中检测到的抗 CD19 抗体变体的 B 细胞耗尽 (总 B 细胞的 ACN): (1) 阴性对照——无人 PBMC; (2) 人 PBMC——**Herceptin®**; (3) 人 PBMC——**Mabthera®**; (4) 人 PBMC——VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) 人 PBMC——VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A。

[0053] 图 15 显示了在 SCID 小鼠的脾脏中检测到的抗 CD19 抗体变体的 B 细胞耗尽

(总 B 细胞的百分数): (1) 阴性对照——无人 PBMC; (2) 人 PBMC——**Herceptin®**; (3) 人 PBMC——**Mabthera®**; (4) 人 PBMC——VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) 人 PBMC——VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明涉及结合人 CD19 的人源化抗体及其片段。

[0056] 本文中使用的术语“人 CD19”包括人 CD19 的变体、同种型和物种同源物。因此, 在某些情况下, 本发明的人源化抗体可与人以外的物种的 CD19 交叉反应。在某些情况下, 抗体可以完全对一种或多种人 CD19 蛋白特异并且可以不表现出物种或其它类型的非人交叉反应。示例性的人 CD19 的完整氨基酸序列具有 SwissProt 登录号 P 15391 (SEQ ID NO: 125)。CD19 也被称为 B 细胞表面抗原 B4、B 细胞抗原 CD19、CD19 抗原和 Leu-12。人 CD19 被 Entrez Gene 称为 GeneID :930, 被 HGNC 称为 HGNC :1633。CD19 可以被称为 CD19 的基因编码。本文中“人 CD19”的使用涵盖了人 CD19 的所有已知的或仍未被发现的等位基因和多态形式。如未另外具体指出, 则本文中使用的术语“CD19”指“人 CD19”。

[0057] 本文中使用的术语“结合人 CD19 的抗体”包括结合人 CD19 的亲合力 (Kd) 为 500nM 或更低, 优选 100nM 或更低, 更优选 50nM 或更低的抗体, 优选 IgG 抗体, 所述人 CD19 例如在 Raji 肿瘤细胞的表面表达的人 CD19, 所述细胞如 Raji 肿瘤细胞 DSMZ ACC319。

[0058] 本文中使用的“B 细胞”或“B 淋巴细胞”意指在骨髓中发育的淋巴细胞类型, 其在血液和淋巴液中循环, 并提供体液免疫。B 细胞识别游离的抗原分子, 并分化或成熟为分泌使抗原失活的免疫球蛋白 (抗体) 的浆细胞。还产生记忆细胞, 所述细胞在之后遇到此类抗原时制造特定的免疫球蛋白 (抗体)。在胰岛 (islet of Langerhans) 中, B 细胞也被称为“ β 细胞”。

[0059] 本文中使用的术语“抗体”包括完整的抗体和任何抗原结合片段或其单链。“抗体”指包括通过二硫键相互连接的至少两条重链 (H) 和两条轻链 (L) 的糖蛋白, 或其抗原结合片段。每条重链都包括重链可变区 (本文中缩写为 VH) 和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域 CH1、CH2 和 CH3。每条轻链都包括轻链可变区 (本文中缩写为 VL) 和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域 CL。VH 和 VL 区可以进一步细分为被称为互补决定区 (CDR) 的超变区, 其分散在被称为框架区 (FR 或 FW) 的更保守的区域中。每个 VH 和 VL 都包括 3 个 CDR 和 4 个 FR, 按下列顺序从氨基端向羧基端排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合, 包括免疫系统的各种细胞 (例如, 效应子细胞) 和经典补体系统的第一补体 (C1q)。

[0060] 本文中使用的术语“嵌合抗体”包括这样的抗体, 其中可变区序列源自一个物种, 而恒定区序列源自另一个物种, 例如可变区序列源自小鼠抗体, 而恒定区序列源自人抗体的抗体。

[0061] 本文中使用的术语“人源化抗体”包括这样的抗体, 其中源自另一种哺乳动物物种 (例如小鼠) 的种系的 CDR 序列被移植到人的框架序列上。在人的框架序列和源自另一种哺乳动物物种的种系的 CDR 序列中也可以进行额外的框架区修饰。

[0062] 本文中使用的术语“人抗体”包括这样的抗体, 所述抗体具有框架和 CDR 区都源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。此外, 如果所述抗体含有恒定区, 则恒定区也源自人种

系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包括不是人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外的随机或定点诱变或者通过体内的体细胞突变导入的突变）。然而，本文中使用的术语“人抗体”并非意在包括这样的抗体，所述抗体中源自另一种哺乳动物物种（例如小鼠）的种系的 CDR 序列被移植到人的框架序列上。

[0063] 如果抗体的可变框架区获得自使用人种系免疫球蛋白基因的系统，则本文中使用的的人源化抗体包括这样的重链或轻链可变框架区，所述可变框架区是特定的人种系序列（人基因）的“产物”或“源自”所述特定的人种系序列。此类系统包括用目标抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠，或者用目标抗原筛选展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。可以通过比较人源化抗体的重链或轻链可变框架区的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的重链或轻链可变框架区的氨基酸序列，来鉴别包括这样的重链或轻链可变框架区的人源化抗体，所述可变框架区是人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”所述人种系免疫球蛋白序列。包括是特定的人种系免疫球蛋白序列的“产物”的重链或轻链可变框架区的人源化抗体具有氨基酸序列与特定的人种系免疫球蛋白序列的重链或轻链可变框架区 100% 相同的重链或轻链可变框架区。由于例如天然存在的体细胞突变或有意导入的定点突变，相比特定种系序列的重链或轻链可变框架区，包括“源自”所述特定的人种系免疫球蛋白序列的重链或轻链可变框架区的人源化抗体可含有氨基酸差异。然而，通常选定的人源化抗体的重链或轻链可变框架区的氨基酸序列与由人种系免疫球蛋白基因的重链或轻链可变框架区编码的氨基酸序列至少 90% 相同，并且，当相比其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列（例如，鼠种系序列）时，含有鉴别所述人源化抗体是源自人的氨基酸残基。在某些情况下，人源化抗体的重链或轻链可变框架区的氨基酸序列与由种系免疫球蛋白基因编码的重链或轻链可变框架区的氨基酸序列可优选至少 95%，更优选至少 96%，最优选至少 97%，特别是至少 98%，最特别是至少 99% 相同。通常，源自特定的人种系序列的人源化抗体的重链或轻链可变框架区将展现出与由人种系免疫球蛋白基因编码的重链或轻链可变框架区的氨基酸序列不超过 10 个、优选不超过 5 个、或者甚至更优选不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸差异。

[0064] 本文中使用的术语“Fab”或“Fab 区”包括包含 VH、CH1、VL 和 CL 免疫球蛋白结构域的多肽。Fab 可以指分离的该区域，或者位于全长抗体或抗体片段环境中的该区域。

[0065] 本文中使用的术语“Fc”或“Fc 区”包括包含除第一恒定区免疫球蛋白结构域以外的抗体恒定区的多肽。因而，Fc 指 IgA、IgD 和 IgG 的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域，和 IgE 和 IgM 的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域，和这些结构域 N 端的柔性铰链。对于 IgA 和 IgM，Fc 可包括 J 链。对于 IgG，Fc 包括免疫球蛋白结构域 C γ 2 和 C γ 3 (C[γ]2 和 C[γ]3)，和在 C γ 1 (C[γ]1) 和 C γ 2 (C[γ]2) 之间的铰链。虽然 Fc 区的边界可以改变，但人 IgG 重链 Fc 区通常定义为在其羧基端包含残基 C226 或 P230，其中编号是根据 Kabat 的 EU 索引。对于人 IgG1，Fc 在本文定义为包含残基 P232 至其羧基端，其中编号是根据 Kabat 中的 EU 索引。Fc 可以指分离的该区域，或者位于 Fc 多肽，例如抗体，环境中的该区域。

[0066] 本文中的术语“铰链”或“铰链区”或“抗体铰链区”包括包含在抗体的第一和第二恒定结构域之间的氨基酸的柔性多肽。结构上，IgG CH1 结构域终止于 EU 220 位，IgG CH2 结构域始于残基 EU 237 位。因而，对于 IgG，本文中抗体铰链定义为包括 221 (IgG1 的 D221) 至 231 (IgG1 的 A231) 位，其中编号是根据 Kabat 的 EU 索引。

[0067] 本文中使用的术语“亲本抗体”或“亲本免疫球蛋白”包括未修饰的抗体，所述抗体之后经修饰产生变体。所述亲本抗体可以是天然存在的抗体，或者天然存在的抗体的变体或改造版本。亲本抗体可以指抗体本身，包含所述亲本抗体的组合物，或其编码氨基酸序列。本文中使用的“亲本抗 CD19 抗体”意指结合人 CD19 的抗体或免疫球蛋白，并经修饰产生变体。

[0068] 本文中使用的术语“亲本抗体”或“亲本免疫球蛋白”包括之后经修饰产生人源化抗体的鼠抗体或嵌合抗体。

[0069] 本文中使用的术语“变体抗体”或“抗体变体”包括由于相比亲本的至少一个氨基酸修饰，而不同于亲本抗体序列的抗体序列。本文中的变体抗体序列优选的具有与亲本抗体序列至少约 80%，最优选至少约 90%，更优选至少约 95% 的氨基酸序列同一性。抗体变体可以指抗体本身，包含所述亲本抗体的组合物，或编码其的氨基酸序列。

[0070] 本文中的术语“氨基酸修饰”包括在多肽序列中的氨基酸取代、插入和 / 或缺失。本文中的“氨基酸取代”或“取代”意指用另一种氨基酸替换亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。例如，取代 R94K 指这样的变体多肽，其中 94 位的精氨酸被赖氨酸替换，此情况为重链可变框架区变体。对于前例，94K 表示用赖氨酸取代 94 位。出于本文的目的，通常通过斜杠分隔多个取代。例如，R94K/L78V 指包含取代 R94K 和 L78V 的双变体。本文中使用的“氨基酸插入”或“插入”意指在亲本多肽序列中的特定位置添加氨基酸。例如，插入 -94 表示在 94 位的插入。本文中使用的“氨基酸缺失”或“缺失”意指去除亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。例如 R94- 表示删除 94 位的精氨酸。

[0071] 本文中使用的术语“保守修饰”或“保守序列修饰”意指不显著影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、插入和缺失。可通过本领域已知的标准技术将修饰导入本发明的抗体中，例如定点诱变和 PCR 介导的诱变。保守的氨基酸取代是用具有相似侧链的氨基酸残基替换氨基酸残基的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括含碱性侧链的氨基酸（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、不带电的极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、 β 分支侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因而，可以用其他相同侧链家族的氨基酸残基替换本发明抗体的 CDR 区中或框架区中的一个或多个氨基酸残基，并可以测试所改变的抗体（变体抗体）保留的功能。

[0072] 本发明中讨论的所有免疫球蛋白重链恒定区位置，都根据 Kabat 的 EU 索引编号（Kabat 等人，1991，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，United States Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，通过引用全文整合）。“Kabat 的 EU 索引”指人 IgG1 EU 抗体的残基编号，如 Edelman 等人，1969，Biochemistry 63 :78-85 所述。

[0073] 本文中使用的术语“全长抗体”包括构成抗体的天然生物学形态的结构，包括可变区和恒定区。例如，在大部分哺乳动物包括人和小鼠中，IgG 类的全长抗体是四聚体，由两对相同的成对免疫球蛋白链组成，每对都具有一条轻链和一条重链，每条轻链都包含免疫球蛋白结构域 VL 和 CL，每条重链都包含免疫球蛋白结构域 VH、CH1 (C[γ]1)、CH2 (C[γ]2)

和 CH3 (C[γ]3)。在一些哺乳动物中,例如骆驼和美洲驼,IgG 抗体可以只由两条重链组成,每条重链都包含与 Fc 区连接的可变结构域。

[0074] 抗体片段包括但不限于:(i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段,包括 Fab' 和 Fab'-SH, (ii) VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段, (iii) 由单个抗体的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(iv) 由单个可变区组成的 dAb 片段 (Ward 等人,1989, Nature 341:544-546);(v) F(ab')₂ 片段,包含 2 个连接的 Fab 片段的二价片段;(vi) 单链 Fv 分子 (scFv),其中 VH 结构域和 VL 结构域通过肽接头连接,所述接头允许两个结构域关联形成抗原结合位点 (Bird 等人,1988, Science 242:423-426;Huston 等人,1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:5879-5883);(vii) 双特异性单链 Fv 二聚体 (PCT/US92/09965);(viii)“二体”或“三体”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (Tomlinson 等人,2000, Methods Enzymol. 326:461-479;W094/13804;Holliger 等人,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:6444-6448);和 (ix) 与相同或不同抗体遗传融合的 scFv (Coloma&Morrison, 1997, Nature Biotechnology 15,159-163)。

[0075] 根据恒定区基因测定,将抗体分类,也称为同种型。人的恒定轻链分为 κ (CK) 和 λ (C[λ]) 轻链。重链分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并分别定义抗体的同种型 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。IgG 类是最常用于治疗目的的。在人中,该类别包括亚类 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在小鼠中,该类别包括亚类 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。IgM 具有亚类,包括但不限于 IgM1 和 IgM2。IgA 具有若干亚类,包括但不限于 IgA1 和 IgA2。因而,本文中使用的“同种型”意指通过恒定区的化学和抗原特征定义的免疫球蛋白的任何类或亚类。已知的人免疫球蛋白同种型是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgD 和 IgE。

[0076] 本文中使用的术语“ADCC”或“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”包括细胞介导的反应,其中表达 Fc[γ]R 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上结合的抗体,之后导致靶细胞的裂解。在各个方面,增强的 ADCC 效应子功能可以意指增强的效价或增强的功效。实验背景中使用的“效价”意指当观察特定的治功效应 EC50 时抗体的浓度(半最大有效浓度)。实验背景中使用的“功效”意指饱和水平的抗体的最大可能的效应子功能。

[0077] 本文中使用的术语“ADCP”或“抗体依赖性细胞介导的吞噬作用”包括细胞介导的反应,其中表达 Fc[γ]R 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上结合的抗体,之后导致靶细胞的吞噬作用。

[0078] 本文中使用的术语“CDC”或“补体依赖性细胞毒性”包括这样的反应,其中一种或多种补体蛋白质组分识别靶细胞上结合的抗体,之后导致靶细胞的裂解。

[0079] 本文中使用的术语“效应子功能”包括由抗体 Fc 区与 Fc 受体或配体相互作用导致的生物化学事件。效应子功能包括 Fc[γ]R-介导的效应子功能,例如 ADCC 和 ADCP,和补体介导的效应子功能,例如 CDC。

[0080] 本文中使用的术语“对象”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖类、爬行类等。优选的对象是人。

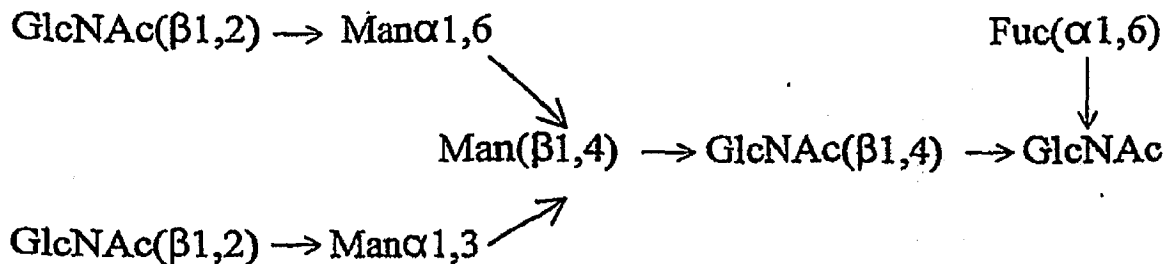
[0081] 本文中使用的术语“同种型变体”包括这样的氨基酸修饰,所述氨基酸修饰将一种同种型的至少一个氨基酸,优选将一种同种型的重链恒定区的至少一个氨基酸,转化为不同的、匹配的同种型中的相应氨基酸。氨基酸修饰可包括整个恒定区免疫球蛋白结构域的

转化,或者优选一种同种型的 Fc 区转化为不同的同种型,例如人 IgG1 重链恒定区的 Fc 区转化为人 IgG3 的 Fc 区导致同种型变体包含人 IgG1 的 CH1、人 IgG1 的铰链和人 IgG3 的 Fc 区。

[0082] 本文中使用的术语“同种型修饰”包括将一种同种型的一个氨基酸转化为不同的、匹配的同种型中的相应氨基酸的氨基酸修饰。例如,因为 IgG1 在 Kabat 的 296 位具有酪氨酸,而 IgG2 具有苯丙氨酸,所以 IgG2 中的 F296Y 取代被认为是同种型修饰。

[0083] 本文中使用的术语“成熟的核心糖类结构”包括与 Fc 区连接的加工的核心糖类结构,所述结构一般包括糖类结构 GlcNAc(岩藻糖)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)₂,即,如下示意性呈现的典型二触角(biantennary)寡糖:

[0084]



[0085] 该术语具体包括缺少 β 1,2GlcNAc 残基的 G-1 型核心成熟糖类结构。然而优选的,核心糖类结构包括两种 β 1,2GlcNAc 残基。本文中的成熟核心糖类结构一般不是高甘露糖基化的。成熟核心糖类结构与糖蛋白的 Fc 区连接,一般通过 N 连接至 Fc 区的 CH2 结构域的 Asn297。

[0086] 抗 CD19 抗体

[0087] 在第一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的重链 CDR3。在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的重链 CDR3;和 / 或包括包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。优选的,所述结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的重链 CDR1,包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的重链 CDR3,和 / 或包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。更优选的,所述结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的重链 CDR1,包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的重链 CDR3;和包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和包含 SEQ ID NO:

32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0088] 本领域普遍已知 CDR3 结构域不依赖于 CDR1 和 / 或 CDR2 结构域, 单独就可以确定抗体对同族抗原的结合特异性, 基于共同的 CDR3 序列可以可预测的产生具有相同结合特异性的多种抗体。参见例如 Klimka 等人, *British J. of Cancer* 83(2) :252-260(2000) (描述了仅使用鼠抗 CD30 抗体 Ki-4 的重链可变结构域 CDR3 生产人源化抗 CD30 抗体); Beiboer 等人, *J. Mol. Biol.* 296 :833-849(2000) (描述了仅使用亲本鼠 MOC-31 抗 EGP-2 抗体的重链 CDR3 序列生产重组的上皮糖蛋白 -2(EGP-2) 抗体); Rader 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 95 :8910-8915(1998) (描述了使用鼠抗整联蛋白 $[\alpha]v[\beta]3$ 抗体 LM609 的重链和轻链可变 CDR3 结构域的一组人源化抗整联蛋白 $[\alpha]v[\beta]3$ 抗体, 其中每个抗体成员在 CDR3 结构域之外都包括不同的序列, 并能够以与亲本鼠抗体同样高或更高的亲和力结合与亲本鼠抗体相同的表位); Barbas 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 116 :2161-2162(1994) (描述了 CDR3 结构域为抗原结合提供了最重要的贡献)。

[0089] 因此, 本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体及其片段, 其包括来自非人动物抗体的一个或多个重链和 / 或轻链 CDR3 结构域, 例如来自鼠抗体 (如 FMC63) 的, 特别是包括包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的重链 CDR3, 和 / 或包含 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的轻链 CDR3, 其中所述抗体能够结合 CD19。在一些实施方案中, 本发明的抗体包括来自非人动物抗体的一个或多个重链和 / 或轻链 CDR3 结构域, 所述抗体与相应的亲本非人 (例如鼠) 抗体 (a) 能够竞争结合; (b) 保留功能特征; (c) 结合相同的表位; 和 / 或 (d) 具有相似的结合亲和力。

[0090] 在另一个方面, 本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括选自 SEQ ID NO :19、20、21、22 和 42 的重链可变区序列, 优选选自 SEQ ID NO :21、22 和 42 的重链可变区序列, 更优选包含 SEQ ID NO :21 的重链可变区序列。

[0091] 在另一个方面, 本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括选自 SEQ ID NO :23、24、25、26 和 41 的轻链可变区序列, 优选选自 SEQ ID NO :25 和 41 的轻链可变区序列, 更优选包含 SEQ ID NO :41 的轻链可变区序列。

[0092] 在一些实施方案中, 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :19、20、21、22 和 42 的重链可变区序列和选自 SEQ ID NO :23、24、25、26 和 41 的轻链可变区序列, 优选选自 SEQ ID NO :21、22 和 42 的重链可变区序列和选自 SEQ ID NO :23、24、25、26 和 41 的轻链可变区序列, 更优选选自 SEQ ID NO :21、22 和 42 的重链可变区序列和选自 SEQ ID NO :25 和 41 的轻链可变区序列, 最优选包含 SEQ ID NO :21 的重链可变区序列和包含 SEQ ID NO :41 的轻链可变区序列。

[0093] 考虑到这些重链和轻链可变区序列各自可以结合人 CD19, 可以“混合和匹配”重链和轻链可变区序列来产生本发明的抗 CD19 结合分子。可以使用例如实施例中描述的结合测定, 来测试此类“混合和匹配”的抗体的 CD19 结合。

[0094] 在另一个方面, 本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段的变体。因而, 本发明提供了人源化抗体或其片段, 具有与重链或轻链的 (例如分别如 SEQ ID NO :21 或 SEQ ID NO :41 的重链和轻链可变区序列的) 亲本人源化抗体的重链和 / 或轻链可变框架区的氨基酸序列至少 80% 相同的重链和 / 或轻链可变框架区的氨基酸序列 (具有至少 80% 氨基酸序列同一性)。优选的, 重链和 / 或轻链可变框架区的氨基酸序列同一性是至少

85%，更优选至少90%，最优选至少95%，特别是96%，更特别97%，甚至更特别98%，最特别99%，包括例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和100%。本文中关于氨基酸序列的同一性或同源性定义为在比对序列和为了实现最大百分比序列同一性，在必要时导入空位后，候选序列中与结合人CD19的人源化抗体或其片段相同的氨基酸残基的百分比。因而，可以通过通常用于比较两条多肽的氨基酸位置相似性的标准方法，来确定序列同一性。使用计算机程序例如BLAST或FASTA，比对两条多肽各自氨基酸的最佳匹配（沿一条或两条序列的全长或者沿一条或两条序列预定的部分）。程序提供了默认的开放罚分和默认的空位罚分，评分矩阵例如PAM250（标准评分矩阵；参见Dayhoff等人，in Atlas of Protein Sequence and Structure, 第5卷, 第3期增补(1978)）可与计算机程序结合使用。例如，百分比同一性可计算为：相同匹配的总数乘以100，再除以匹配跨度中较长序列的总长度和为了比对两条序列向较长序列中导入的空位数。

[0095] 在一些实施方案中，本发明因而提供了结合人CD19的人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体或其片段包括与SEQ ID NO:19、20、21、22或42的框架区序列至少80%相同的重链可变框架区序列，和/或与SEQ ID NO:23、24、25、26和41的框架区序列至少80%相同的轻链可变框架区序列。

[0096] 在一些实施方案中，本发明提供了结合人CD19的人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体或其片段包括与SEQ ID NO:21、22或42的框架区序列至少80%相同的重链可变框架区序列，和/或与SEQ ID NO:25或41的框架区序列至少80%相同的轻链可变框架区序列。在一些实施方案中，本发明提供了结合人CD19的人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体或其片段包括与SEQ ID NO:21的框架区序列至少80%相同的重链可变框架区序列，和/或与SEQ ID NO:41的框架区序列至少80%相同的轻链可变框架区序列。

[0097] 在另一个方面，本发明提供了结合人CD19的人源化抗体或其片段，其包括如上文所述的重链和/或轻链CDR，并还包括这样的重链可变框架区，所述重链可变框架区是选自V3-33 * 01(SEQ ID NO:11)、V3-11 * 01(SEQ ID NO:12)、V3-30 * -18(SEQ ID NO:13)和V3-48 * 01(SEQ ID NO:14)的人基因的产物或源自所述人基因；优选这样的重链可变框架区，所述重链可变框架区是V3-30 * -18(SEQ ID NO:13)或V3-48 * 01(SEQ ID NO:14)的人基因的产物或源自所述人基因；更优选这样的重链可变框架区，所述重链可变框架区是V3-30 * -18(SEQ ID NO:13)的人基因的产物或源自所述人基因。重链可变框架区可包括一个或多个（例如，1、2、3和/或4个）重链框架区序列（例如，框架1(FW1)、框架2(FW2)、框架3(FW3)和/或框架4(FW4)），其存在于这些人基因的产物中或源自这些人基因。优选的，重链可变区框架包括FW1、FW2和/或FW3，更优选FW1、FW2和/或FW3，存在于选自V3-33 * 01(SEQ ID NO:11)、V3-11 * 01(SEQ ID NO:12)、V3-30 * -18(SEQ ID NO:13)和V3-48 * 01(SEQ ID NO:14)的人基因的产物中或源自所述人基因。本文使用的重链框架区序列包括FW1（位置1至位置25）、FW2（位置36至位置49）、FW3（位置66至位置94）和FW4（位置103至位置113），其中利用Kabat中提出的编号系统表示所述氨基酸位置。

[0098] 在另一个方面，本发明提供了结合人CD19的人源化抗体或其片段，其包括这样的轻链可变框架区，所述轻链可变框架区是选自V1-5 * 03(SEQ ID NO:3)、V1-27 * 01(SEQ

ID NO:4)、V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 和 V1-12 * 01 (SEQ ID NO:6) 的人基因的产物或源自所述人基因;优选这样的轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是 V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 的人基因的产物或源自所述人基因。轻链可变区框架区可包括一个或多个(例如,1、2、3 和 / 或 4 个)轻链框架区序列(例如,框架 1(FW1)、框架 2(FW2)、框架 3(FW3) 和 / 或框架 4(FW4)),其存在于这些人基因的产物中或源自这些人基因。优选的,轻链可变区框架包括 FW1、FW2 和 / 或 FW3,更优选 FW1、FW2 和 FW3,其存在于选自 V1-5 * 03 (SEQ ID NO:3)、V1-27 * 01 (SEQ ID NO:4)、V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 和 V1-12 * 01 (SEQ ID NO:6) 的人基因的产物中或源自所述人基因。本文使用的轻链框架区序列包括 FW1(位置 1 至位置 23)、FW2(位置 35 至位置 49)、FW3(位置 57 至位置 88) 和 FW4(位置 98 至位置 108),其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示所述氨基酸位置。

[0099] 在一些实施方案中,结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括这样的重链可变框架区和这样的轻链可变框架区,所述重链可变框架区是选自 V3-33 * 01 (SEQ ID NO:11)、V3-11 * 01 (SEQ ID NO:12)、V3-30 * -18 (SEQ ID NO:13) 和 V3-48 * 01 (SEQ ID NO:14) 的人基因的产物或源自所述人基因,所述轻链可变框架区是选自 V1-5 * 03 (SEQ ID NO:3)、V1-27 * 01 (SEQ ID NO:4)、V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 和 V1-12 * 01 (SEQ ID NO:6) 的人基因的产物或源自所述人基因;优选这样的重链可变框架区和这样的轻链可变框架区,所述重链可变框架区是 V3-30 * -18 (SEQ ID NO:13) 或 V3-48 * 01 (SEQ ID NO:14) 的人基因的产物或源自所述人基因,所述轻链可变框架区是 V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 的人基因的产物或源自所述人基因;更优选这样的重链可变框架区和这样的轻链可变框架区,所述重链可变框架区是 V3-30 * -18 (SEQ ID NO:13) 的人基因的产物或源自所述人基因,所述轻链可变框架区是 V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 的人基因的产物或源自所述人基因。

[0100] 本发明还涵盖了存在于不同的人基因的产物中或源自所述人基因的重链可变区框架区,和 / 或存在于不同的人基因的产物中或源自所述人基因的轻链可变区框架区的组合,例如,存在于 V3-30 * -18 (SEQ ID NO:13) 的产物或源自 V3-30 * -18 (SEQ ID NO:13) 的 FW1 和 FW2,与存在于 V3-48 * 01 (SEQ ID NO:14) 的产物中或源自 V3-48 * 01 (SEQ ID NO:14) 的 FW3 组合,和 / 或存在于 V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 的产物中或源自 V1-39 * -01 (SEQ ID NO:5) 的 FW1 和 FW2,与存在于 V1-12 * 01 (SEQ ID NO:6) 的产物中或源自 V1-12 * 01 (SEQ ID NO:6) 的 FW3 组合。

[0101] 人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见于“VBase”人种系序列数据库中(可获得自因特网的 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase),以及 Kabat, E. A. 等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M. 等人, (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; 和 Cox, J. P. L 等人, (1994) "A Directory of Human Germline VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836。如另一个实例,人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见于 Genbank 数据库。

[0102] 在另一个方面,本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其中至少一个重链 CDR 和 / 或至少一个轻链 CDR 包括至少一个氨基酸修饰。可以实施定点诱变或 PCR

介导的诱变,来导入修饰,并可以在如本文所述的和实施例中提供的体外或体内测定中评估对抗体结合的影响或者其他的目标功能特性。优选的导入保守修饰。修饰可以是氨基酸取代、添加或缺失,但优选是取代。通常,在 CDR 区中实施不超过 5 个,优选不超过 4 个,更优选不超过 3 个,甚至更优选不超过 2 个,最优选不超过 1 个的氨基酸修饰。

[0103] 因而,本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含重链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F 的氨基酸修饰,和 / 或包括包含重链 CDR2 中的氨基酸取代 Y58F 或 Y59F 的氨基酸修饰,和 / 或包括包含重链 CDR3 中的一个或多个选自 Y96F、Y97F、Y98F 和 Y100_bF 的氨基酸取代的氨基酸修饰。人源化抗体或其片段的优选的氨基酸修饰是重链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F,和重链 CDR3 中的选自 Y96F、Y97F、Y98F 和 Y100_bF 的氨基酸取代。人源化抗体或其片段的更优选的氨基酸修饰是重链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F,和 / 或重链 CDR3 中的氨基酸取代 Y100_bF。

[0104] 本发明还提供了人源化抗体或其片段,其包括包含轻链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F 的氨基酸修饰,和 / 或包括包含轻链 CDR3 中的选自 N92A、T93A 和 T93V 的氨基酸取代的氨基酸修饰。人源化抗体或其片段的优选的氨基酸修饰是轻链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F,和 / 或轻链 CDR3 中的氨基酸取代 N92A。

[0105] 在一些实施方案中,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括包含重链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F 的氨基酸修饰,和 / 或包括包含重链 CDR2 中的氨基酸取代 Y58F 或 Y59F 的氨基酸修饰,和 / 或包括包含重链 CDR3 中的一个或多个选自 Y96F、Y97F、Y98F 和 Y100_bF 的氨基酸取代的氨基酸修饰,且包括包含轻链 CDR1 中的氨基酸取代 Y32F 的氨基酸修饰,和 / 或包括包含轻链 CDR3 中的选自 N92A、T93A 和 T93V 的氨基酸取代的氨基酸修饰。

[0106] 在某些实施方案中,框架序列可用于改造可变区,产生变体抗体。本发明的变体抗体包括对 VH 和 / 或 VK 中的框架区残基进行了修饰的变体,例如改善抗体的特性。通常,进行此类框架区修饰来减少抗体的免疫原性。例如,一种方法是“回复突变”一个或多个框架区残基为相应的鼠序列,或者“回复突变”一个或多个框架区残基为相应的种系序列。

[0107] 因而在另一个方面,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段的至少一个重链可变区的框架区包括来自相应鼠抗体的重链可变区的相应框架区的至少一个氨基酸修饰。优选的,所述氨基酸修饰是氨基酸取代。通常,在框架区内实施不超过 5 个,优选不超过 4 个,更优选不超过 3 个,甚至更优选不超过 2 个,最优选不超过 1 个的氨基酸修饰。

[0108] 在一些实施方案中,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其中重链可变区的框架区的氨基酸修饰包括在选自 37、42、48、49、67、71、78 和 94 的氨基酸位置上的氨基酸取代。优选的重链可变区的框架区的氨基酸取代是在选自 42、67、71、78 和 94 的氨基酸位置上的。更优选的重链可变区的框架区的氨基酸取代是选自 G42R、F67L、R71K、L78V 和 R94K,其条件是如果氨基酸修饰是 R94K,则重链可变区序列不是 SEQ ID NO :19 或 SEQ ID NO :20,而 R94K 是重链可变区的框架区的最优选的氨基酸取代。

[0109] 本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其中所述人源化抗体或其片段的至少一个轻链可变区的框架区包括来自相应鼠抗体的轻链可变区的相应框架区的至少一个氨基酸修饰。优选的,所述氨基酸修饰是氨基酸取代。通常,在框架区内实施不超

过 5 个, 优选不超过 4 个, 更优选不超过 3 个, 甚至更优选不超过 2 个, 最优选不超过 1 个的氨基酸修饰。在一些实施方案中, 本发明提供了人源化抗体或其片段, 其中轻链可变区序列的框架区的氨基酸修饰包括在选自 44、71 和 87 的氨基酸位置上的氨基酸取代。更优选的轻链可变区序列的框架区的氨基酸取代是选自 P44V、P44I、P44L、F71Y、F71H、F71S、F71T 和 Y87F。最优选的轻链可变区序列的框架区的氨基酸取代是选自 P44V、P44I、F71Y 和 Y87F, 而 P44I 是特别优选的。

[0110] 在一些实施方案中, 本发明的人源化抗体或其片段可包括如上文所述的重链可变区序列的框架区的氨基酸修饰, 和如上文所述的轻链可变区序列的框架区的氨基酸修饰。

[0111] 本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括选自 SEQ ID NO :33、34、35、36、37、43、44、45、46、47、54 和 55 的重链可变区, 优选选自 SEQ ID NO :37、43 和 47, 更优选选自 SEQ ID NO :37 和 47 的重链可变区。

[0112] 本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括选自 SEQ ID NO :25、38、39、40、48、49、50、51、52、53、56、57、58、59、60、61、62 和 63 的轻链可变区, 优选选自 SEQ ID NO :25、59 和 60, 更优选选自 SEQ ID NO :59 和 60 的轻链可变区。

[0113] 在一些实施方案中, 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :33、34、35、36、37、43、44、45、46、47、54 和 55 的重链可变区, 和选自 SEQ ID NO :25、38、39、40、48、49、50、51、52、53、56、57、58、59、60、61、62 和 63 的轻链可变区。

[0114] 在一些实施方案中, 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :37、43 和 47 的重链可变区, 和选自 SEQ ID NO :25、59 和 60 的轻链可变区。在更优选的实施方案中, 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO :37 和 47 的重链可变区, 和选自 SEQ ID NO :59 和 60 的轻链可变区。最优选的是结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :60 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :25 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :49 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :49 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :43 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区; 特别是结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :60 的氨基酸序列的轻链可变区; 结合人 CD19 的人源化抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO :47 的氨基酸序列的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0115] 考虑到每种上述重链和轻链可变区序列都可以结合人 CD19, 可以“混合和匹配”重链和轻链可变区序列, 来产生本发明的抗 CD19 结合分子。可以使用例如实施例中描述的结

合测定,来测试此类“混合和匹配”的抗体的 CD19 结合。

[0116] 在一些实施方案中,结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :64 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

[0117] 在一些实施方案中,结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :67 的氨基酸序列的轻链序列。

[0118] 在一些实施方案中,结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。

[0119] 本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其还包括人重链和 / 或轻链恒定结构域。人重链恒定区可选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgD 和 IgE 构成的人免疫球蛋白的组,而人重链恒定区 IgG,特别是 IgG1 是优选的。人轻链恒定区可选自 κ 或 λ 恒定区构成的人免疫球蛋白的组,而人 κ 恒定区是优选的。在一些优选的实施方案中,所述人源化抗体或其片段包括人 IgG1 重链恒定结构域和人轻链 κ 恒定结构域。本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括人重链和 / 或轻链恒定区,其中人重链恒定区包括包含人 IgG1 的 CH1、人 IgG1 的铰链区和人 IgG3 的 Fc 区的同种型变体。优选的包含同种型变体的人源化抗体是全长抗体。对于包括包含人 IgG1 的 CH1、人 IgG1 的铰链区和人 IgG3 的 Fc 区的同种型变体的结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,特别优选的是包括包含 SEQ ID NO :124 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列。已发现同种型变体表现出改善的补体依赖性细胞毒性 (CDC),这是相比下述结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段包括人 IgG1 的人重链恒定区 (通常是天然的人 IgG1),即相比只有涉及修饰的重链恒定区时不同于同种型变体的结合人 CD19 的人源化抗体或其片段。

[0120] 本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体片段,所述片段选自 Fab、Fab'、Fab' -SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')₂、scFv、双特异性单链 Fv 二聚体、双抗体、三链抗体和与相同或不同抗体遗传融合的 scFv。优选的片段是 scFv、双特异性单链 Fv 二聚体和双抗体。本发明还提供了结合人 CD19 的全长人源化抗体。

[0121] 除了在框架区或 CDR 区进行修饰外,或作为其备选,还可以改造本发明的抗体以包括 Fc 区内的修饰,通常改变抗体的一种或多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc 受体结合,和 / 或抗原依赖性细胞的细胞毒性。此外,可以化学修饰 (例如,可以在抗体上连接一个或多个化学部分) 或修饰本发明的抗体,改变它的糖基化。下文进一步详细描述了每种这类实施方案。如下概述的 Fc 区内的修饰是根据 Kabat 的 EU 索引的 Fc 区内的残基编号。在一个实施方案中,修饰 CH1 的铰链区,使得改变铰链区内的半胱氨酸残基数,例如增加或减少。该方法进一步描述在 Bodmer 等人的美国专利号 5,677,425 中。改变 CH1 的铰链区内的半胱氨酸残基数,以例如促进轻链和重链装配,或增加或减少抗体的稳定性。在另一个实施方案中,突变抗体的 Fc 铰链区,以减少抗体的生物学半衰期。更具体而言,在 Fc 铰链片段的 CH2-CH3 结构域交界区中导入一个或多个氨基酸突变,使得抗体相比天然的 Fc 铰链结构域 SpA 结合具有受损的葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 结合。该方法进一步描述在 Ward 等人的美国专利号 6,165,745 中。在另一个实施方案中,修饰抗体以增加其生物学半衰期。多种方法都是可以的。例如,可以导入一种或多种下列突变 :T252L、T254S、T256F,如 Ward 等人的美国专利号 6,277,375 所述。可选的,为了增加生物学半衰期,可以在 CH1 或

CL 区中改变抗体,以含有取自 IgG 的 Fc 区的 CH2 结构域的 2 个环中的补救受体 (salvage receptor) 结合表位,如 Presta 等人的美国专利号 5,869,046 和 6,121,022 所述。在其他实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基来改变 Fc 区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基 234、235、236、237、297、318、320 和 322 的一个或多个氨基酸,使得抗体具有与效应子配体改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应子配体可以是例如 Fc 受体或补体的 C1 组分。该方法进一步描述在 Winter 等人的美国专利号 5,624,821 和 5,648,260 中。在另一个实例中,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基 329、331 和 322 的一个或多个氨基酸,使得抗体具有改变的 C1q 结合和 / 或降低或消除的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。该方法进一步描述在 Idusogie 等人的美国专利号 6,194,551 中。在另一个实例中,改变 CH2 结构域的 N 端区域中氨基酸位置 231 至 238 中的一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。该方法进一步描述在 Bodmer 等人的 PCT 公开 WO 94/29351 中。在另一个实例中,修饰 Fc 区以增加抗体介导抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 的能力,和 / 或增加抗体对 Fc[γ] 受体的亲和力,通过修饰下列位置上的一个或多个氨基酸:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439。该方法进一步描述在 Presta 的 PCT 公开 WO 00/42072 中。

[0122] 因而,在优选的实施方案中,本发明提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其包括相对于亲本抗体的人 IgG Fc 区,包含至少一个氨基酸修饰的变体人 IgG Fc 区,而所述包含变体人 IgG Fc 区的抗体表现出相比亲本抗体改变的效应子功能。优选的,所述抗体包括变体人 IgG1Fc 区。更优选的是包括变体人 IgG1Fc 区的全长抗体。亲本抗体是结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,并且除了在人 IgG Fc 区中的氨基酸修饰外,与包含变体人 IgG Fc 区的结合人 CD19 的人源化抗体相同,通常是具有天然的人 IgG Fc 区的抗体。氨基酸修饰优选是非同种型的。

[0123] 改变的效应子功能通常是补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和 / 或 C1q 结合和 / 或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或抗体对 Fc[γ] 受体的结合亲和力,优选补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和 / 或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。通过标准的体外测定测量 CDC、C1q 结合、ADCC 和抗体对 Fc[γ] 受体的结合亲和力,所述测定是本领域已知的和可商购的。通常,通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测定测量 ADCC,例如本申请实施例 4 中所述,通过基于细胞的测定测量 CDC,例如本申请实施例 10 中所述。

[0124] 在一个实施方案中,相比亲本抗体改变效应子功能的氨基酸修饰包括在选自 269、274、276、298、324 和 334 的氨基酸位置上的氨基酸取代,优选选自 269、298 和 324,更优选 298 和 / 或 324,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0125] 在另一实施方案中,相比亲本抗体改变效应子功能的氨基酸修饰包括选自 E269D、K274Q、N276K、S298A、S324N 和 K334R 的氨基酸取代,优选选自 E269D、S298A 和 S324N,更优选 S298A 和 / 或 S324N,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0126] 在另一实施方案中,相比亲本抗体改变效应子功能的氨基酸修饰包括在选自以下的氨基酸位置上的氨基酸取代的组合:269/274、269/276、269/298、269/324、

269/334、274/276、274/298、274/324、274/334、276/298、276/324、276/334、298/324、298/334、324/334、269/274/276、269/274/298、269/274/324、269/274/334、269/276/298、269/276/324、269/276/334、269/298/324、269/298/334、274/276/298、274/276/324、274/276/334、274/298/324、274/298/334、276/298/324 和 276/298/334，优选选自 274/276、269/298、298/324、274/276/334 和 269/298/324，更优选选自 298/324 和 269/298/324，其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0127] 在另一实施方案中，相比亲本抗体改变效应子功能的氨基酸修饰包括选自以下的氨基酸取代的组合：E269D/K274Q、E269D/N276K、E269D/S298A、E269D/S324N、E269D/K334R、K274Q/N276K、K274Q/S298A、K274Q/S324N、K274Q/K334R、N276K/S298A、N276K/S324N、N276K/K334R、S298A/S324N、S298A/K334R、S324N/K334R、E269D/K274Q/N276K、E269D/K274Q/S298A、E269D/K274Q/S324N、E269D/K274Q/K334R、E269D/N276K/S298A、E269D/N276K/S324N、E269D/N276K/K334R、E269D/S298A/S324N、E269D/S298A/K334R、K274Q/N276K/S298A、K274Q/N276K/S324N、K274Q/N276K/K334R、K274Q/S298A/S324N、K274Q/S298A/K334R、N276K/S298A/S324N 和 N276K/S298A/K334R，优选选自 K274Q/N276K、E269D/S298A、S298A/S324N、K274Q/N276K/K334R 和 E269D/S298A/S324N，更优选选自 S298A/S324N 和 E269D/S298A/S324N，其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0128] 优选的，包含变体人 IgG Fc 区的本发明的人源化抗 CD19 抗体在如上所述的体外测定中表现出相比亲本抗体改善的 CDC。本文中使用的表现出的改善的 CDC 包括 a) 相比亲本抗体表现出增强的 CDC，即，亲本抗体已表现出 CDC，所述 CDC 通过人 IgG Fc 区的氨基酸修饰而增强，和 b) 相比亲本抗体重新表现出 CDC，即，亲本抗体没有表现出 CDC，因而通过人 IgG Fc 区的氨基酸修饰重新导入 CDC。

[0129] 在其他实施方案中，相比亲本抗体在体外测定中表现出改善的 CDC 的本发明的人源化抗 CD19 抗体的人 IgG Fc 区变体包括在选自以下的氨基酸位置上的氨基酸取代或氨基酸取代的组合：324、334、274/276、298/324、274/276/334 和 269/298/324，所述位置优选选自 324、334、298/324、274/276/334 和 269/298/324，更优选选自 324、298/324 和 269/298/324，其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0130] 在其他实施方案中，本发明的人源化抗 CD19 抗体的人 IgG Fc 区变体包括选自以下的氨基酸位置上的氨基酸取代或氨基酸取代的组合：S324N、K334R、K274Q/N276K、S298A/S324N、K274Q/N276K/K334R 和 E269D/S298A/S324N，优选选自 S324N、K334R、S298A/S324N、K274Q/N276K/K334R 和 E269D/S298A/S324N，更优选选自 S324N、S298A/S324N 和 E269D/S298A/S324N，所述人 IgG Fc 区变体相比亲本抗体在体外测定中表现出改善的 CDC，其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0131] 在其他实施方案中，本发明的人源化抗 CD19 抗体的人 IgG Fc 区变体包括在选自以下的氨基酸位置上的氨基酸取代或氨基酸取代的组合：269、298、269/298、269/324、298/324 和 269/298/324，所述位置优选选自 298、269/298、269/298/324，所述人 IgG Fc 区变体相比亲本抗体在体外测定中表现出改善的 ADCC，其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0132] 在其他实施方案中，本发明的人源化抗 CD19 抗体的人 IgG Fc 区变体包括在选自以下的氨基酸位置上的氨基酸取代或氨基酸取代的组合：E269D、S298A、E269D/S298A、

E269D/S324N、S298A/S324N和E269D/S298A/S324N,优选选自S298A、E269D/S298A和E269D/S298A/S324N,所述人IgG Fc区变体相比亲本抗体在体外测定中表现出改善的ADCC,其中利用Kabat中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0133] 本发明提供的结合人CD19并相比亲本人源化抗体表现出改变的效应子功能的特别优选的人源化抗体或其片段是这样的人源化抗体或其片段,其包括包含SEQ ID NO:114(VH16R94K/S298A)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:115(VH16R94K/E269D/S298A)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:116(VH16R94K/S298A/S324N)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:117(VH16R94K/E269D/S298A/S324N)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:118(VH16R94K/S324N)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:119(VH16R94K/K274Q)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:120(VH16R94K/N276K)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:121(VH16R94K/K334R)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;包含SEQ ID NO:122(VH16R94K/K274Q/N276K)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列;或者包含SEQ ID NO:123(VH16R94K/K274Q/N276K/K334R)的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID NO:65(VL43V3Q/T7S/P44I/N92A)的氨基酸序列的轻链序列。

[0134] 本发明还提供了结合人CD19的人源化抗体或其片段,其中所述抗体包括变体人IgG Fc区,所述变体人IgG Fc区包括用天冬酰胺替换亲本抗体的氨基酸324位的丝氨酸的氨基酸取代S324N,而包括所述变体人IgG Fc区的抗体相比亲本抗体表现出改善的补体依赖性细胞毒性(CDC)。优选的所述抗体包括变体人IgG1Fc区。更优选的是包括变体人IgG1Fc区的全长抗体。令人惊讶的发现,如实施例10所述,在氨基酸324位的16种不同的氨基酸取代中,相比亲本抗体,取代S324N显著地改善了CDC,而其他的取代相比亲本抗体没有改善CDC。在不受理论约束的条件下,S324N取代对CDC的这一预料不到的选择性影响似乎是由于与人补体组分C1q的增强的结合。

[0135] 本发明还提供了包括人IgG Fc区的结合人CD19的人源化抗体或其片段,其中与所述人IgG Fc区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖。优选的,所述抗体包括人IgG1Fc区,其中与所述人IgG1Fc区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖。更优选的是包括人IgG1Fc区的全长抗体,其中与所述人IgG1Fc区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖。从W02003/035835已知,与人IgG Fc区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖可增强ADCC。因而,在其它实施方案中,本发明的人源化抗体或其片段包括这样的人IgG Fc区,其中与所述人IgG Fc区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖,而所述缺乏岩藻糖的抗体相比不缺乏岩藻糖的亲本人源化抗体或其片段表现出增强的ADCC。包括这样的人IgG Fc区的结合人CD19的优选抗体或其片段是包括包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链序列和包含SEQ ID

NO:65 的氨基酸序列的轻链序列的抗体,其中与所述人 IgG Fc 区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖,而所述缺乏岩藻糖的抗体相比不缺乏岩藻糖的亲本人源化抗体或其片段表现出增强的 ADCC。产生缺乏岩藻糖的抗体的方法是例如 (a) 使用改造或突变的宿主细胞,所述宿主细胞是岩藻糖代谢缺陷的,使得其对其中表达的蛋白质岩藻糖基化能力降低(或不能岩藻糖基化);(b) 在阻止或降低岩藻糖基化的条件下培养细胞;(c) 翻译后去除岩藻糖(例如,使用岩藻糖苷酶);(d) 翻译后添加理想的糖类,例如,在重组表达未糖基化的糖蛋白之后;或者(e) 纯化糖蛋白,选择没有岩藻糖基化的产物。优选使用的是实施例 14 描述的方法,例如 Longmore 等人(1982) *Carbohydr. Res.* 365-92 或 Imai-Nishiya 等人,(2007), *BMC Biotechnol.* 7,84 中描述的方法。

[0136] 抗 CD19 抗体特性

[0137] 评估抗体例如人 CD19 的抗体的结合能力的标准测定是本领域已知的,包括例如 ELISA、Western 印迹、RIA 和流式细胞仪分析。合适的测定详细描述在实施例中。也可以通过本领域已知的标准测定来评估抗体的结合动力学(例如,结合亲和力如 K_d),例如 Scatchard 或 Biacore<(R)> 系统分析,并可如例如实施例 3 所述实施和计算。可以通过本领域已知的标准竞争性测定来评估相对结合亲和力 K_i ,并可如例如实施例 3 所述实施和计算。为了评估结合,可以使用 Raji 肿瘤细胞(人伯基特淋巴瘤,DSMZACC319)、NALM-6(人 B 细胞前体白血病,DSMZ AC128) 或 SU-DHL-6(人 B 细胞淋巴瘤,DSMZ ACC572),优选使用 Raji 肿瘤细胞,例如人伯基特淋巴瘤,DSMZ ACC319 或 SU-DHL-6(人 B 细胞淋巴瘤,DSMZ ACC572),更优选使用 Raji 肿瘤细胞,例如人伯基特淋巴瘤,DSMZACC319。可以从公众可获得的来源获得这些细胞,例如 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, 德国,并可用于标准测定例如流式细胞分析。可用于本发明测定中的相应嵌合抗体通常是鼠抗体 FMC63 的嵌合版,其由与人 IgG1 重链恒定结构域融合的 FMC63 鼠重链可变结构域,和与 κ 恒定结构域融合的鼠轻链可变结构域组成。优选用于本发明测定中的相应嵌合抗体是抗体 FMC63 的嵌合版,其包括包含 SEQ ID NO:68 的氨基酸序列的重链序列,与包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列的轻链序列。亲本非人源化抗体或可用于本发明测定中的相应亲本非人源化抗体通常是鼠抗体,特别是鼠抗体 FMC63。

[0138] 本发明还提供了结合 Raji 肿瘤细胞的人源化抗体或其片段,其相对于相应嵌合抗体的结合的中点荧光(MPF)为至少 10%。Raji 肿瘤细胞在表面上表达人源化抗体或其片段可以结合的 CD19。可以使用流式细胞仪根据测量染色细胞的平均荧光强度(MFI)对比抗体浓度来获得中点荧光值。优选的,相对于相应嵌合抗体的结合,人源化抗体或其片段结合 Raji 肿瘤细胞的 MPF 为至少 30%,更优选至少 50%,最优选至少 70%,特别是至少 80%,更特别是至少 90%,最特别是至少 95%。如上文所述的 Raji 肿瘤细胞可用于评估与 CD19 的结合。

[0139] 本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其亲和力(K_d)为 50nM 或更低,特别是 40nM 或更低,更特别是 30nM 或更低,甚至更特别是 20nM 或更低,最特别是 15nM 或更低。如上文所述的 Raji 肿瘤细胞可用于评估与人 CD19 的结合。

[0140] 本发明还提供了保留了相应嵌合抗体的至少 20% 的 CD19 结合亲和力(K_d)的人源化抗体或其片段。优选的所述人源化抗体或其片段保留了相应嵌合抗体的至少 40%,更优选至少 60%,最优选至少 80%,特别是至少 90%,更特别是至少 95% 的 CD19 结合亲和力

(K_d)。如上文所述的 Raji 肿瘤细胞或 SU-DHL-6 细胞可用于评估与人 CD19 的结合。

[0141] 本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段结合人 CD19,且竞争结合 Raji 肿瘤细胞,所述结合的亲和力 (K_i) 为 50nM 或更低,优选 20nM 或更低,更优选 10nM 或更低,最优选 5nM 或更低,特别是 4nM 或更低,更特别是 3nM 或更低,最特别是至少约 1.5nM 至约 5.0nM(例如,1.9;1.6 或 2.9 至约 2.6 或 4.9nM)。通常针对相应的嵌合抗体测量结合竞争,而如上文所述的 Raji 肿瘤细胞可用于评估 K_i 。

[0142] 本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段结合人 CD19,且在 Raji 肿瘤细胞中诱导凋亡。可以通过膜联蛋白 -V 和碘化丙啶染色测量 Raji 肿瘤细胞中的凋亡诱导 (Vermes 等人,1995, *J. Immunol. Methods.* 184 :39-51)。根据相应的嵌合抗体对凋亡没有影响的事实,诱导凋亡是本发明的人源化抗体展现出的非常令人惊讶的特性。如上文所述的 Raji 肿瘤细胞可用于评估凋亡。因而,本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,其中在至少 10%,优选至少 15%,更优选至少 20%,最优选至少 25%的 Raji 肿瘤细胞中诱导凋亡。

[0143] 本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段结合人 CD19,且在 Raji 肿瘤细胞中诱导 ADCC。可以使用例如乳酸脱氢酶释放测定 (CytoTox 96 非放射性测定, Promega, Madison, USA), 来评估如上文所述的靶细胞,例如 Raji 肿瘤细胞的 ADCC 相关性特异性裂解。令人惊讶的是,结合人 CD19 的人源化抗体或其片段在 Raji 肿瘤细胞中诱导的 ADCC 活性等于,甚至大于相应的嵌合抗体诱导的 ADCC 活性。优选的,结合 CD19 的人源化抗体或其片段具有相应的嵌合抗体至少 80%,更优选至少 100%,最优选至少 120%的 ADCC 活性。

[0144] 本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段结合人 CD19,且抑制恶性 B 细胞的增殖。优选的,所述人源化抗体或其片段保留了相应嵌合抗体的至少 60%,更优选至少 80%,最优选至少 90%,特别是 95%,更特别是 100%的对恶性 B 细胞增殖的抑制。为了测量抗体对细胞增殖的抑制,可以使用如上文所述的 Raji 肿瘤细胞或 SU-DHL-6 细胞评估恶性 B 细胞增殖。

[0145] 本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段结合人 CD19,且抑制 Raji 肿瘤细胞的克隆发生。通过在用抗体处理后计数克隆数,测量对克隆发生的抑制,可根据例如 Nahimana 等人,2009, *Blood.* 0 :blood-2008-08-173369v1” (*Blood*, 2009, 卷 113, No. 14, pp. 3276-3286) 进行。可以使用如上文所述的 Raji 肿瘤细胞评估克隆发生。在用本发明的人源化抗体处理后计数的克隆数比用相应嵌合抗体处理后计数的克隆数少至少 30%,优选至少 40%,更优选至少 50%,最优选至少 60%。对 Raji 肿瘤细胞的克隆发生的抑制验证了本发明的人源化抗体对恶性 B 细胞增殖的强抑制功能。

[0146] 本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段结合人 CD19,且导致血液中的 B 细胞耗尽。优选的,所导致的 B 细胞耗尽与相应嵌合抗体导致的 B 细胞耗尽至少相同,优选是其至少 1.5 倍,更优选是其至少 2 倍。可以如实施例所述,通过用抗体孵育后,确定全血中的 %阳性 B 细胞,来评估 B 细胞耗尽。

[0147] 本发明还提供了这样的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段结合人 CD19,且在 Raji 肿瘤细胞中内化。本发明的人源化抗体或其片段的内化程度可与相应嵌合抗体的内化程度相比。优选的,以 0.01 μ g/ml 使用的本发明的人源化抗体的内化程度是

相应嵌合抗体的内化程度的 50%和 150%之间,更优选 60%和 140%之间,最优选 70%和 130%之间。可以使用例如与毒素肥皂草毒蛋白缀合的次级抗人抗体,在如上文所述的 Raji 肿瘤细胞上评估抗体内化 (Hum-Zap, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA)。

[0148] 本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段具有热稳定温度大于 65°C,优选大于 70°C,更优选大于 75°C,最优选大于 80°C 的 FAB 片段。为了分析 FAB 片段的热稳定性,使用差示扫描量热法,而鉴别在全长 IgG 背景中的 FAB 片段的中点熔融温度。这类量热法测量是技术人员已知的,可根据例如 Garber 和 Demarest (2007), BBRC 355 :751-7 进行。令人惊讶的是,已发现本发明的人源化抗体具有等于相应嵌合抗体的 FAB 片段热稳定温度。因而,本发明还提供了结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,所述人源化抗体或其片段具有等于相应嵌合抗体的 FAB 片段热稳定温度的 FAB 片段热稳定温度。

[0149] 核酸、载体和宿主细胞

[0150] 本发明还提供了编码结合人 CD19 的人源化抗体和其片段分离的核酸、载体以及包含所述核酸或载体的宿主细胞。核酸可位于完整细胞中、细胞裂解液中或者以部分纯化的或基本纯化的形式。当通过标准技术,包括碱 /SDS 处理、CsCl 分带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和其他本领域普遍已知的技术,与其他细胞组分或其他污染物(例如,其他的细胞核酸或蛋白质)纯化分离时,核酸是“分离的”或“使得基本纯的”,参见例如 F. Ausubel, 等人编著, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本发明的核酸可以是例如 DNA 或 RNA,可以含有或不含有内含子序列。在优选的实施方案中,核酸是 cDNA 分子。

[0151] 可以使用标准的分子生物学技术获得本发明的核酸,例如可以通过标准的 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术,获得编码抗体的轻链和重链或者编码 VH 和 VL 区段的 cDNA。对于从免疫球蛋白基因文库获得的抗体(例如,使用噬菌体展示技术),可以从文库回收编码抗体的一种或多种核酸。向宿主细胞中导入外源核酸的方法是本领域普遍已知的,并可随所使用的宿主细胞而变化。技术包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、氯化钙处理、聚凝胺 (polybrene) 介导的转染,原生质体融合、电穿孔、病毒或噬菌体感染、在脂质体中封装多核苷酸和直接显微注射 DNA 到核中。在哺乳动物细胞的情况下,转染可以是瞬时或稳定的。

[0152] 优选的本发明核酸分子是编码选自 SEQ ID NO :25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 和 63 的轻链可变区,和 / 或选自 SEQ ID NO :33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 和 55 的重链可变区的那些。更优选的是这样的核酸分子,所述核酸分子编码包含 SEQ ID NO :64 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列;编码包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :67 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO :66 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO :114 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO :115 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO :116 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO :117 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列的轻链

序列;或编码包含 SEQ ID NO:118 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO:119 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO:120 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO:121 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO:122 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO:123 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列;或编码包含 SEQ ID NO:124 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链序列。

[0153] 本发明还提供了分离的核酸,其包括结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的重链编码核酸序列,于 2010 年 2 月 5 日保藏在 DSMZ 的微生物中,具有登录号 DSM 23302。由保藏的结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的核酸序列编码的重链包括包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的重链 CDR1,包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的重链 CDR2,和包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的重链 CDR3。

[0154] 本发明还提供了分离的核酸,其包括结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的轻链编码核酸序列,于 2010 年 2 月 5 日保藏在 DSMZ 的微生物中,具有登录号 DSM 23303。由保藏的结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的核酸序列编码的轻链包括包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链 CDR1,包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0155] 因而,本发明还提供了这样的结合人 CD19 的人源化抗体或其片段,其由包含结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的重链编码核酸序列的分离的核酸和包括结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的轻链编码核酸序列的分离的核酸所编码,所述重链编码核酸序列于 2010 年 2 月 5 日保藏在 DSMZ 的微生物中,具有登录号 DSM 23302,所述轻链编码核酸序列于 2010 年 2 月 5 日保藏在 DSMZ 的微生物中,具有登录号 DSM 23303。

[0156] 在一个实施方案中,由分离的核酸编码的结合人 CD19 的人源化抗体或其片段包括变体人 IgG Fc 区,优选变体人 IgG1Fc 区,其中所述分离的核酸包括结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的重链编码核酸序列,所述重链编码核酸序列于 2010 年 2 月 5 日保藏在 DSMZ 的微生物中,具有登录号 DSM 23302,所述变体人 IgG Fc 区包括在选自 269,274,276,298,324 和 334,优选选自 269,298 和 324,更优选 298 和 / 或 324 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示每一组成员的氨基酸位置。

[0157] 一旦获得编码 VH 和 VL 区段的 DNA 片段,则可以通过标准的重组 DNA 技术进一步操作这些 DNA 片段,例如将可变区基因转化为全长抗体链基因,或转化为对应于上文所述片段的片段基因,如 Fab 片段或转化为 scFv 基因。在这些操作中,将 VL 或 VH 编码 DNA 片段有效的连接至编码另一种蛋白质的另一种 DNA 片段上,例如抗体恒定区或柔性接头。该上下文中使用的术语“有效连接”意指连接两个 DNA 片段,使得所述两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保留在框内。通过将 VH 编码 DNA 与另一种编码重链恒定区 (CH1、CH2 和 CH3) 的 DNA 分子有效连接,可以将编码 VH 区的分离的 DNA 转化为全长重链基因。这些人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat,E. A. 等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,U. S. Department of Health and Human Services, NIH

Publication No. 91-3242), 可以通过标准 PCR 扩增获得涵盖了这些区域的 DNA 片段。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区, 但最优选是 IgG1 恒定区。对于 Fab 片段重链基因, 可以将 V[pi]- 编码 DNA 与另一种只编码重链 CH1 恒定区的 DNA 分子有效连接。通过将 VL 编码 DNA 与另一种编码轻链恒定区 CL 的 DNA 分子有效连接, 可以将编码 VL 区的分离的 DNA 转化为全长轻链基因 (以及 Fab 轻链基因)。这些人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的 (参见例如, Kabat, E. A. 等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services. NIH Publication No. 91-3242), 可以通过标准 PCR 扩增获得涵盖了这些区域的 DNA 片段。在优选的实施方案中, 轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区, 优选 κ 恒定区。为了产生 scFv 基因, 可以将 VH 和 VL- 编码 DNA 片段与另一种编码柔性接头的片段有效连接, 例如, 编码氨基酸序列 (GIy4-Ser)₃ 的片段, 使得 VH 和 VL 序列可以作为连续的单链蛋白质表达, 其中 VL 和 VH 区通过柔性接头连接 (参见例如, Bird 等人, (1988) Science 242 :423-426 ;Huston 等人, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85 :5879-5883 ;McCafferty 等人, (1990) Nature 348 :552-554)。已开发了各种技术生产人源化抗体的抗体片段。传统上, 这些片段源自完整抗体的蛋白质水解消化 (参见例如, Morimoto 等人, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24 :107-117 (1992) ;和 Brennan 等人, Science, 229 :81 (1985))。然而, 现在可以通过重组宿主细胞直接生产这些片段。例如, 可以从上文讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可选的, 可以从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段, 并将其化学偶联形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等人, Bio/Technology, 10 :163-167 (1992))。根据另一种方法, 可以从重组宿主细胞培养物中直接分离 F(ab')₂ 片段。生产抗体片段的其他技术对熟练的技术人员而言是显而易见的。在其他实施方案中, 选定的抗体是单链 Fv 片段 (scFv), 参见例如 WO 1993/16185 ;美国专利号 5, 571, 894 和美国专利号 5, 587, 458。抗体片段还可以是“线性抗体”, 例如美国专利号 5, 641, 870 所述。

[0158] 为了表达蛋白质, 可以将编码本发明抗体的核酸整合到表达载体中。多种表达载体可用于蛋白质表达。表达载体可包括自我复制的染色体外载体, 或整合到宿主基因组中的载体。构建的表达载体与宿主细胞类型是可相容的。因而, 可用于本发明的表达载体包括但不限于使蛋白质能够在哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞、酵母和体外系统中表达的那些。如本领域已知的, 多种表达载体是可商业或以其他方式获得的, 可用于本发明中来表达抗体。

[0159] 表达载体通常包括与控制或调控序列、可选择的标志物、任何融合伙伴和 / 或其他元件有效连接的蛋白质。本文中, “有效连接” 意指核酸置于与另一种核酸序列的功能性关联中。术语“调控序列” 意在包括启动子、增强子和控制抗体链基因转录或翻译的其他表达控制元件 (例如, 多聚腺苷酸化信号)。此类调控序列描述在例如 Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)) 中。一般而言, 这些表达载体包括与编码抗体的核酸有效连接的转录和翻译调控核酸, 且通常对用于表达所述蛋白质的宿主细胞是恰当的。一般而言, 转录和翻译调控序列可包括启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列, 和增强子或激活子序列。还如本领域已知的, 表达载体通常含有选择基因或标志物, 允许选择含有表达载体的转化的宿主细胞。选择基因是本领域普遍已知的, 可随使用的宿主细胞而变化。例如, 通常可选择的标志物基因赋予已导入载体的宿主细胞对药物的抗性, 例如 G418、潮霉

素或氨基喋呤。优选的可选择的标志物基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (用于用氨基喋呤选择 / 扩增的 dhfr- 宿主细胞中) 和 neo 基因 (用于 G418 选择)。

[0160] 用于在克隆或表达本文载体中的 DNA 的合适的宿主细胞是原核细胞、酵母或更高等的真核细胞。用于该目的的合适的原核细胞包括真细菌, 包括革兰氏阴性生物或革兰氏阳性生物, 例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 如埃希氏菌属 (*Escherichia*) 例如大肠杆菌、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷菌属 (*Serratia*) 例如粘质沙雷菌 (*Serratia marcescans*), 和志贺菌属 (*Shigella*), 以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 例如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 例如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。合适的大肠杆菌克隆宿主包括大肠杆菌 294 (ATCC 31,446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC 27,325)。

[0161] 除原核细胞外, 真核微生物例如丝状真菌或酵母是合适的克隆或表达宿主。在低等真核宿主微生物中, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或普通的贝克酵母是最常用的。然而, 多种其他属、种和菌株通常是可获得且有效的, 例如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主, 包括乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC24,178)、*K. Walthamii* (AJCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosopmarum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 或 *K. marxianus* yarrowia (EP 402226); 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP183,070); 念珠菌属 (*Candida*); 里氏木霉 (*Trichoderma reesia* (EP244234)); 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*); 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 例如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*); 和丝状真菌, 包括链孢霉属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、*Tolypocladium* 或曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主例如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 或黑曲霉 (*A. niger*)。

[0162] 用于表达本发明的人源化抗体的合适的宿主细胞源自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括 *plaril* 和昆虫细胞。已鉴别了多种杆状病毒菌株和变体, 与相应的许可昆虫宿主细胞, 所述细胞来自宿主例如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*)。用于转染的多种病毒菌株是公众可获得的, 例如苜蓿尺蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 菌株, 此类病毒可特别用于转染草地贪夜蛾细胞。还可以利用棉花、玉米、土豆、大豆、牵牛、西红柿和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0163] 用于表达本发明的重组抗体的宿主细胞优选的是哺乳动物宿主细胞, 包括中国仓鼠卵巢巢细胞 (CHO 细胞) (包括 dhfr⁻CHO 细胞, 描述在 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 中, 与 DHFR 可选择标志物一起使用, 例如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621 所述)、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。特别的, 为了与 NSO 骨髓瘤细胞一起使用, 另一种优选的表达系统是 GS 基因表达系统, 公开在 WO 87/04462 (Wilson)、WO 89/01036 (Bebbington) 和 EP 338841 (Bebbington)

中。当将重组的抗体基因导入哺乳动物宿主细胞中时,通过培养宿主细胞一定时间来生产抗体,所述时间足以允许抗体在所述宿主细胞中的表达,或更优选的,允许抗体分泌到所述宿主细胞生长的培养基中。可以在多种培养基中培养用于生产结合人 CD19 的抗体的宿主细胞。可商购的培养基例如 Ham' s F10(Sigma)、最低必需培养基((MEM),(Sigma))、RPMI-1640(Sigma 或 Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 和 Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium((DMEM),(Sigma)) 适合培养宿主细胞。可以使用标准的蛋白质纯化方法,从培养基中回收抗体。

[0164] 抗体可与融合伙伴有效连接,使得能够进行表达的蛋白质的靶向、纯化、筛选、展示等。融合伙伴可通过接头序列与抗体序列连接。接头序列一般包括少量氨基酸,通常少于 10 个,但也可以使用更长的接头。通常,选择柔性且抗降解的接头序列。对本领域技术人员显而易见的是,任一种多样的序列都可用作接头。例如,普通的接头序列包括氨基酸序列 GGGGS。融合伙伴(partner)可以是靶向序列或信号序列,指导抗体和任何相关的融合伙伴到达理想的细胞位置或胞外基质中。如本领域已知的,某些信号序列可以将蛋白质靶向分泌到生长基质中,或位于细胞的内膜和外膜之间的周质空间中。融合伙伴还可以是编码使得能够纯化和/或筛选的肽或蛋白质的序列。此类融合伙伴包括但不限于多聚组氨酸标签(His-tag)(例如 H6 和 H10 或其它与固定化金属亲和层析(IMAC)系统一起使用的标签(例如, Ni⁺²亲和柱))、GST 融合物、MBP 融合物、Strep- 标签、细菌酶 BirA 的 BSP 生物素化靶序列,和由抗体靶向的表位标签(例如 c-myc 标签、flag 标签等)。对本领域技术人员显而易见的是,此类标签可用于纯化、筛选或两者。

[0165] 构建和生产抗体

[0166] 通过技术人员已知的重组 DNA 技术生产抗体。此外,可以通过酶促或化学切割天然存在的抗体,来生产抗体。可以通过将来自非人动物(例如小鼠)的 VH 和/或 VL 区的一个或多个 CDR 或其部分转移至人 VH 和/或 VL 区的一个或多个框架区上,来构建本发明的人源化抗体。任选的,当减少抗体的免疫原性和/或维持结合亲和力需要或理想时,可以通过相应的非人(例如小鼠)残基替换位于 VH 和/或 VL 区中的人框架残基。任选的,可以用人残基替换位于 CDR 中的非人氨基酸残基。可以基于如上所述制备的非人单克隆抗体的序列,来制备本发明的嵌合或人源化抗体。可以从目的非人杂交瘤中获得编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA,并使用标准的分子生物学技术将其改造为含有非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠可变区与人恒定区连接(参见例如, Cabilly 等人的美国专利号 4,816,567)。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入到人框架中(参见例如, Winter 等人的美国专利号 5,225,539, 和 Queen 等人的美国专利号 5,530,101 ;5,585,089 ;5,693,762 和 6,180,370)。

[0167] 可以构建本发明的人源化抗体,其中基于在潜在的受体分子可变区和鼠抗体重链可变区之间的同源性的考虑,来选择重链可变区的人受体分子。种系候选人受体分子优选是降低潜在的免疫原性的。种系数据库由读取时穿过重链 FW3 区的末端且部分至 CDR3 序列的抗体序列构成。为了选择 FW4 区,可以搜索源自选定的种系分子的成熟抗体序列数据库,或使用源自人类供体的选定的种系分子的抗体序列。人受体分子优选选自与鼠供体分子相同的重链类型,而且是与鼠供体分子的可变区相同的经典结构类型。针对重链可变区选择人受体分子的次要考虑是规避鼠供体分子和人受体分子之间在 CDR 长度上的同源性。

优选通过搜索 V-BASE 数据库的同源性,来选择人受体抗体分子,但也可以使用其他数据库如 Kabat 和公开的 NCBI 数据库。

[0168] 可以构建本发明的人源化抗体,其中基于在潜在的受体分子可变区和鼠抗体轻链可变区之间的同源性的考虑,来选择轻链可变区的人受体分子。种系候选人受体分子优选是降低潜在的免疫原性的。种系数据库由读取时穿过重链 FW3 区的末端且部分至 CDR3 序列的抗体序列构成。为了选择 FW4 区,可以搜索源自选定的种系分子的成熟抗体数据库,或使用源自人类供体的选定的种系分子的抗体序列。人受体分子优选选自与鼠供体分子相同的轻链类型,且是与小鼠供体分子的可变区相同的经典结构类型。针对轻链可变区选择人受体分子的次要考虑包括鼠供体分子和人受体分子之间在 CDR 长度上的同源性。优选通过 V-BASE 数据库的同源性搜索,来选择人受体抗体分子,但也可以使用其他数据库如 Kabat 和公开的 NCBI 数据库。人源化非人抗体的方法如本文所述,包括下文实施例。

[0169] 本发明提供了生产结合人 CD19 的人源化抗体或其片段的方法,包括培养包含分离的核酸(编码结合人 CD19 的人源化抗体或其片段)或包含含有分离的核酸(编码结合人 CD19 的人源化抗体或其片段)的载体的宿主细胞,使得核酸表达并生产抗体。优选分离所述抗体。

[0170] 可以使用上文所述作为宿主细胞、核酸和载体。可以通过例如本领域普遍已知的(例如, Morrison, S. (1985) Science 229 :1202) 和上文进一步概述的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合,获得核酸表达。例如,为了表达抗体或其抗体片段,可以通过标准的分子生物学技术(例如 PCR 扩增或使用表达目标抗体的杂交瘤的 cDNA 克隆)获得编码部分或全长的轻链和重链 DNA,并可将所述 DNA 插入到载体中,例如表达载体。选择的表达载体和表达控制序列与所使用的表达宿主细胞是可相容的。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到分离的载体中,或更通常的,两种基因都插入到同一表达载体中。通过标准方法(例如,连接抗体基因片段和载体上互补的限制性位点,或者如果不存在限制性位点时平端连接)将抗体基因插入到表达载体中。通过将本文所述的抗体轻链和重链可变区插入到已编码理想同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得 VH 区段与载体内的 CH 区段有效连接, VK 区段与载体内的 CL 区段有效连接,将其用来产生任何抗体同种型的全长抗体基因。

[0171] 抗 CD19 抗体的表征和纯化

[0172] 可以测试本发明的抗体与人 CD19 的结合,通过例如标准的 ELISA 或与 Raji 肿瘤细胞的结合。可以以本领域技术人员已知的多种方式分离或纯化本发明的抗体。标准的纯化方法包括层析技术,包括在大气压下进行的离子交换层析、疏水相互作用层析、亲和层析、尺寸层析或凝胶过滤层析,和反相层析,或使用系统例如 FPLC 和 HPLC 在高压下进行。纯化方法还包括电泳的、免疫学的、沉淀、透析和层析聚焦技术。超滤和透析过滤技术也可与蛋白质浓缩结合使用。为了纯化抗 CD19 抗体,可以在例如用于单克隆抗体纯化的转瓶中生长选定的宿主细胞。在用蛋白 A 琼脂糖 (Pharmacia, Piscataway, NJ) 的亲和层析之前,可以过滤和浓缩上清液。可以通过凝胶电泳和高效液相层析检测洗脱的 IgG,以保证纯度。

[0173] 免疫缀合物

[0174] 在另一个方面,本发明提供了与治疗剂连接的结合人 CD19 的人源化抗 CD19 抗体或其片段,所述治疗剂例如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素。此类

缀合物在本文中称为“免疫缀合物”。包括一种或多种细胞毒素的免疫缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞致命（例如杀死细胞）的任何活性剂。实例包括紫杉醇 (taxol)、细胞松弛素 B (cytochalasin B)、短杆菌肽 D (gramicidin D)、溴化乙锭 (ethidium bromide)、依米丁 (emetine)、丝裂霉素 (mitomycin)、依托泊苷 (etoposide)、替尼泊苷 (teniposide)、长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、秋水仙碱 (colchicin)、多柔比星 (doxorubicin)、柔红霉素 (daunorubicin)、二羟基蒽醌 (dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、光神霉素 (mithramycin)、放线菌素 D (actinomycin D)、1-脱氢睾酮 (1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素 (glucocorticoids)、普鲁卡因 (procaine)、丁卡因 (tetracaine)、利多卡因 (lidocaine)、普萘洛尔 (propranolol), 和嘌呤霉素 (puromycin) 及其类似物或同源物。治疗剂还包括例如抗代谢剂（例如, 氨甲蝶呤 (methotrexate)、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、6-硫代鸟嘌呤 (6-thioguanine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、5-氟尿嘧啶氨基脒 (5-fluorouracil decarbazine)、烷化剂（例如, 氮芥 (mechlorethamine)、塞替派苯丁酸氮芥 (thioepa chlorambucil)、美法仑 (melphalan)、卡莫司汀 (carmustine) (BSNU) 和 洛莫司汀 (lomustine) (CCNU)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、白消安 (busulfan)、二溴甘露醇 (dibromomannitol)、链脲霉素 (streptozotocin)、丝裂霉素 C (mitomycin C) 和顺式-二氯二胺铂 (II) (cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) 顺铂 (cisplatin)、蒽环类 (anthracyclines)（例如, 柔红霉素 (daunorubicin)（原道诺霉素 (daunomycin) 和多柔比星 (doxorubicin)、抗生素（例如, 更生霉素 (dactinomycin)（原放线菌素 (actinomycin)、博来霉素 (bleomycin)、光神霉素 (mithramycin) 和安曲霉素 (anthramycin) (AMC)）和抗有丝分裂剂（例如, 长春新碱 (vincristine) 和长春碱 (vinblastine)）。可以与本发明抗体连接的治疗性细胞毒素的其他实例包括多卡米星 (duocarmycins)、加利车霉素 (calicheamicins)、美坦辛 (maytansines) 和 auristatins, 及其衍生物。加利车霉素抗体缀合物的实例是可商购的 (**Mylotarg®**; American Home Products)。可以使用本领域可获得的接头技术连接本发明的抗体与细胞毒素。用于缀合细胞毒素与抗体的接头类型的实例包括但不限于脘硫醚、酯、二硫化物和含肽接头。可以选择例如对溶酶体区室内的低 pH 切割敏感的或对蛋白酶切割敏感的接头, 所述蛋白酶例如在肿瘤组织中优先表达的蛋白酶, 如组织蛋白酶 (例如, 组织蛋白酶 B、C、D)。关于细胞毒素、接头类型和将治疗剂与抗体缀合的方法的进一步讨论, 还参见 Saito, G 等人, (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 :199-215 ;Trail, P. A 等人, (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52 :328-337 ;Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3 :207-212 ;Allen, T. M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2 :750-763 ;Pastan, I. 和 Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3 :1089-1091 ;Senter, P. D. 和 Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 :247-264。本发明的抗体还可与放射性同位素连接, 产生细胞毒性的放射药物, 也被称为放射性免疫缀合物。可与用于诊断或治疗性抗体缀合的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、铟¹¹¹、钇 90 和镭 177。本领域已建立了制备放射性免疫缀合物的方法。放射性免疫缀合物的实例是可商购的, 包括 **Zevalin®** (EDEC Pharmaceuticals) 和 **Bexxar®** (Corixa Pharmaceuticals), 相似的方法可用于制备使用本发明抗体的放射性免疫缀合物。本发明的抗体免疫缀合物可用于修饰给定的生物学应答, 而药物部分不被视为限制于经典化学治

疗剂。例如,药物部分可以是具有理想生物学活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括例如酶促活性毒素,或其活性片段,例如相思豆毒蛋白(abrin)、蓖麻毒蛋白A(ricin A)、假单胞菌外毒素(pseudomonas exotoxin)或白喉毒素(diphtheria toxin);蛋白质例如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物学应答修饰剂,例如淋巴因子、白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、白介素-6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或其它生长因子。

[0175] 连接此类治疗剂与抗体的技术是普遍已知的,参见例如 Arnon 等人,“ Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 等人(编著),第243-56页(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人,“ Antibodies For Drug Delivery”, in Controlled Drug Delivery(第2版), Robinson 等人(编著),第623-53页(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “ Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy :A Review”, in Monoclonal Antibodies' 84 :Biological And Clinical Applications, Pinchera 等人(编著),第475-506页(1985); “ Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin 等人(编著),第303-16页(Academic Press 1985)和 Thorpe 等人, Immunol. Rev., 62 :119-58(1982)。

[0176] 药物组合物

[0177] 在另一个方面,本发明提供了组合物,例如药物组合物,其包括本发明的人源化抗体或其片段和药学可接受的载体。此类组合物可包括一种本发明的抗体或免疫缀合物,或其组合(例如,两种或多种不同的抗体或免疫缀合物)。例如,本发明的药物组合物包括结合靶抗原的不同表位,或具有互补活性的抗体(或免疫缀合物)的组合。本发明的药物组合物还可以在组合疗法中施用,即与其它活性剂组合。例如,组合疗法可包括与至少一种其它的抗炎剂或免疫抑制剂组合的本发明的抗 CD19 抗体。

[0178] 本文中使用的“药学可接受的载体”包括任意的和所有的溶剂、分散基质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗的和延迟吸附的活性剂,以及诸如此类生理学相容的。优选的,载体是适合静脉内、肌内、皮下、不经肠道的、脊柱的或表皮施用的(例如,通过注射或输注)。根据施用途径,活性化合物(即,抗体或免疫缀合物)可包被在材料中,保护所述化合物免受可能灭活所述化合物的酸和其它天然条件的作用。药学可接受的载体包括无菌的含水溶液或分散液,和用于即时制备的无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。此类基质和活性剂用于药学活性物质的用途是本领域已知的。除非是与所述活性化合物不相容的任何常规基质或活性剂,否则可考虑其在本发明的药物组合物中的用途。补充的活性化合物也可被掺入到所述组合物中。

[0179] 在另一个方面,本发明提供了包含免疫缀合物和药学可接受的载体的组合物,所述免疫缀合物包括与治疗剂连接的结合人 CD19 的人源化抗体或其片段。可如上文所述使用免疫缀合物和治疗剂。

[0180] 本发明的药物组合物还可包括药学可接受的抗氧化剂。药学可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如棕榈酰抗坏血酸酯(ascorbyl palmitate)、丁基羟

基茴香醚 (BHA)、丁基羟基甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α 生育酚等;和 (3) 金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。可用于本发明的药物组合物中的合适的含水和不含水载体的实例包括水、乙醇、多元醇 (例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等) 及其合适的混合物、植物油例如橄榄油,和可注射的有机酯例如油酸乙酯。例如通过使用包被材料 (如卵磷脂),通过维持所需的颗粒大小 (分散体的情形下) 和通过使用表面活性剂,可以维持恰当的流动性。这些组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以通过上文的灭菌程序和通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂来确保防止存在微生物,所述抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、山梨酸苯酚 (phenol sorbic acid) 等。组合物中包括等渗剂也是理想的,例如糖、氯化钠等。此外,通过包括延迟吸附的后星级,例如单硬脂酸铝和明胶,可以产生可注射的药物形式的延长吸附。

[0181] 治疗和其他用途

[0182] 本发明的人源化抗体具有多种体外和体内的诊断和治疗性用途,涉及 CD19 介导的病症的诊断和治疗。例如,可以在体外或离体条件下,将这些分子施用给培养的细胞,或例如在体内条件下,施用给人类对象,来治疗、预防和诊断多种 CD19 介导的病症。优选的对象是人,包括患 CD19 活性介导的病症 (CD19 介导的病症) 的患者。方法特别适合治疗患与异常 B 细胞群体相关的 CD19 介导的病症的人类患者。

[0183] 出于本发明的目的,“患者”包括人和其他动物,优选哺乳动物和最优选人。因而,本发明的抗体同时具有人类治疗和兽医应用。本发明中的术语“治疗”意在包括治疗性治疗,以及对疾病或病症的预防性或抑制性的手段。因而,例如,在疾病发动前成功的施用抗体,导致疾病的治疗。作为另一个实例,在疾病的临床表征后成功的施用抗体,来抗争疾病的症状,包括疾病的治疗。“治疗”还涵盖了在疾病出现后,为了消除所述疾病而施用抗体。在发动后或出现临床症状后成功的施用抗体,伴随临床症状的可能的减轻以及也许疾病的缓解,包括了疾病的治疗。上述“需要治疗的”包括已患所述疾病或病症的,以及倾向于患所述疾病或病症的哺乳动物,包括要被预防疾病或病症的那些。

[0184] 在特定的实施方案中,人源化抗体在体内用于治疗、预防或诊断多种 CD19 介导的疾病。因而,本发明提供了在对象中治疗 CD19 介导的病症的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的人源化抗体或其片段。示例性的 CD19 介导的病症包括包含类风湿性关节炎的自身免疫病症,癌症、非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin' s lymphoma)、急性淋巴细胞白血病 (acute lymphocytic leukemia) (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia) (CLL)、多毛细胞白血病 (hairy cell leukemia)、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤 (anaplastic large-cell lymphomas) (ALCL)、皮肤 T- 细胞淋巴瘤 (cutaneous T-cell lymphomas)、结节性小裂细胞淋巴瘤 (nodular small cleaved-cell lymphomas)、外周 T- 细胞性淋巴瘤 (peripheral T-cell lymphomas)、伦纳特淋巴瘤 (Lennert' s lymphomas)、免疫母细胞性淋巴瘤 (immunoblastic lymphomas)、T- 细胞白血病 / 淋巴瘤 (ATLL) (T-cell leukemia/lymphomas)、成人 T- 细胞白血病 (adult T-cell leukemia) (T-ALL)、内分芽型 / 中心细胞性 (cb/cc) 滤泡型淋巴瘤癌症 (entroblastic/centrocytic(cb/cc)follicular lymphomas cancers)、B 系弥漫性大细胞淋巴瘤 (diffuse large cell lymphomas of B lineage)、血管免疫母细胞淋巴结病 (AILD)- 样 T 细胞性淋巴瘤 (angioimmunoblastic lymphadenopathy(AILD)-like T cell lymphoma)、HIV 相

关性体腔淋巴瘤 (HIV associated body cavity based lymphomas)、胚性癌 (Embryonal Carcinomas)、鼻咽部的未分化癌 (undifferentiated carcinomas of the rhino-pharynx) (例如, 施明克瘤 (Schmincke' s tumor))、卡斯尔曼病 (Castleman' s disease)、卡波氏肉瘤 (Kaposi' s Sarcoma)、多发性骨髓瘤 (Multiple Myeloma)、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom' s macroglobulinemia)、抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症和其他的 B 细胞淋巴瘤和白血病。抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症是例如利妥昔单抗 (**Rituxan®**) 耐受性 B 细胞癌症, 这是优选的抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症。优选的癌症是血液癌症, 尤其是涉及表达 CD19 的淋巴瘤和白血病的癌症, 特别是非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、多毛细胞白血病。用本发明的抗体治疗的优选的 CD19 介导的病症选自非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、多毛细胞白血病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE) 和抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症。用本发明的抗体治疗的更优选的 CD19 介导的病症是类风湿性关节炎、非霍奇金淋巴瘤或抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症。

[0185] “自身免疫病症”包括同种异体胰岛移植排斥 (allogenic islet graft rejection)、斑秃 (alopecia areata)、强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis)、抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome)、自身免疫性艾迪生病 (autoimmune Addison' s disease)、抗嗜中性粒细胞细胞质自身抗体 (antineutrophil cytoplasmic autoantibodies) (ANCA)、肾上腺的自身免疫病 (autoimmune diseases of the adrenal gland)、自身免疫性溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia)、自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis)、自身免疫性心肌炎 (autoimmune myocarditis)、自身免疫性嗜中性白血球减少症 (autoimmune neutropenia)、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎 (autoimmune oophoritis and orchitis)、自身免疫性血小板减少症 (autoimmune thrombocytopenia)、自身免疫性风疹 (autoimmune urticaria)、白塞氏病 (Behcet' s disease)、大疱性类天疱疮 (bullous pemphigoid)、心肌病 (cardiomyopathy)、Castleman 氏综合征 (Castleman' s syndrome)、celiac spruce-dermatitis、慢性疲劳免疫机能失常综合征 (chronic fatigue immune dysfunction syndrome)、慢性炎症脱髓鞘性多神经病 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)、丘斯综合征 (Churg-Strauss syndrome)、疤痕性类天疱疮 (cicatrical pemphigoid)、CREST 综合征 (CREST syndrome)、冷凝集素疾病 (cold agglutinin disease)、克罗恩氏病 (Crohn' s disease)、皮炎 (dermatomyositis)、盘状狼疮 (discoid lupus)、特发性混合性冷球蛋白血症 (essential mixed cryoglobulinemia)、因子 VIII 缺陷 (factor VIII deficiency)、纤维肌痛 - 纤维肌炎 (fibromyalgia-fibromyositis)、肾小球肾炎 (glomerulonephritis)、格雷夫斯氏病 (Grave' s disease)、Guillain-Barre, 古德帕斯彻氏综合征 (Goodpasture' s syndrome)、移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease (GVHD))、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto' s thyroiditis)、血友病 A (hemophilia A)、特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis)、特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenia purpura) (ITP)、IgA 神经病 (IgA neuropathy)、IgM 多发性神经病 (IgM polyneuropathies)、免疫介导的血小板减少症 (immune mediated thrombocytopenia)、青春期关节炎 (juvenile arthritis)、川崎病 (Kawasaki' s disease)、lichen planus、

红斑狼疮 (lupus erthematosis)、美尼尔氏病 (Meniere' s disease)、混合型结缔组织病 (mixed connective tissue disease)、多发性硬化 (multiple sclerosis (MS))、I 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus)、重症肌无力 (myasthenia gravis)、寻常天疱疮 (pemphigus vulgaris)、恶性贫血 (pernicious anemia)、结节性多发性动脉炎 (polyarteritis nodosa)、多软骨炎 (polychondritis)、多腺体综合征 (polyglandular syndromes)、风湿性多肌痛 (polymyalgia rheumatica)、多肌炎 (polymyositis) 和皮肌炎 (dermatomyositis)、原发性无丙种球蛋白血症 (primary agammaglobulinemia)、原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)、银屑病 (psoriasis)、牛皮癣关节炎 (psoriatic arthritis)、Reynauld 氏现象 (Reynauld' s phenomenon)、莱特尔综合征 (Reiter' s syndrome)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis) (RA)、肉状瘤病 (sarcoidosis)、硬皮病 (scleroderma)、干燥综合征 (Sjogren' s syndrome)、实体器官移植排斥 (solid organ transplant rejection)、僵人综合征 (stiff-man syndrome)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus) (SLE)、大动脉炎 (takayasu arteritis)、暂时性动脉炎 / 巨细胞动脉炎 (temporal arteritis/giant cell arteritis)、血栓性血小减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenia purpura)、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis)、眼色素层炎 (uveitis)、血管炎病 (vasculitides) 例如疱疹样皮炎脉管炎 (dermatitis herpetiformis vasculitis)、白癜风 (vitiligo)、与抗中性白细胞胞质抗体相关的脉管炎 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis)、移植物抗宿主病 (graft vs. host disease)、冷球蛋白血症 (cryoglobulinemia)、IgM 介导的神经病 (IgM mediated neuropathy)、视神经脊髓炎 (neuromyelitis optica)、特发性膜性肾病 (idiopathic membranous nephropathy)、斜视性眼阵挛 (opsoclonus myoclonus) 和韦格纳氏肉芽肿病 (Wegner' s granulomatosis)。

[0186] 此外,考虑 CD19 在多种肿瘤细胞上的表达,并考虑如上所述本发明的人源化抗体或其片段抑制表达 CD19 的恶性 B 细胞增殖的事实,CD19 介导的疾病优选是肿瘤发生性病症,如癌症,例如特征是存在表达 CD19 的肿瘤细胞的病症,包括例如非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、多毛细胞白血病、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、多发性骨髓瘤、皮肤 T- 细胞淋巴瘤、结节性小裂细胞淋巴瘤、淋巴细胞白血病 (lymphocytic lymphomas) 外周 T- 细胞性淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、T- 细胞白血病 / 淋巴瘤 (ATLL)、成人 T- 细胞白血病 (T-ALL)、内分芽型 / 中心细胞性 (cb/cc) 滤泡型淋巴瘤癌症、B 系弥漫性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞淋巴瘤 (AILD) - 样 T 细胞性淋巴瘤、HIV 相关性体腔淋巴瘤、胚性癌、鼻咽部的未分化癌 (例如,施明克瘤)、卡斯尔曼病、卡波氏肉瘤、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症、抗 CD20 抗体耐受性 B 细胞癌症和其他的 B 细胞淋巴瘤和白血病。

[0187] 因而在其他方面,本发明提供了抑制表达 CD19 的肿瘤细胞生长的方法,包括将细胞与本发明的人源化抗体或其片段接触,其量有效的抑制肿瘤细胞的生长。肿瘤细胞通常选自人伯基特淋巴瘤细胞、人 B 细胞前体白血病细胞、人 B 细胞白血病细胞或人 B 细胞淋巴瘤细胞,优选人伯基特淋巴瘤细胞或人 B 细胞淋巴瘤细胞。

[0188] 考虑本发明的人源化抗体或其片段导致血液中的 B 细胞耗尽的事实,本发明还提供了耗尽对象中的 B 细胞的方法,包括向对象施用一定量的本发明的人源化抗体或其片

段,所述量有效的耗尽对象中的 B 细胞。

[0189] 在一个实施方案中,本发明的抗体可用于检测 CD19 的水平,或在其膜表面含有 CD19 的细胞的水平,所述水平之后可与某些疾病症状关联。可选的,抗体可用于抑制或阻断 CD19 功能,反过来可与某些疾病症状的预防或缓解相关,从而提示 CD19 作为疾病的介质。这可以通过在允许抗体和 CD19 之间形成复合体的条件下,将样品和对照样品与抗 CD19 抗体接触来实现。检测在抗体和 CD19 之间形成的任何复合体,并比较样品和对照。根据本发明抗体与 CD19 的特异性结合,本发明抗体可用于特异性检测细胞表面表达的 CD19 表达,进而可用于通过免疫亲和纯化来纯化 CD19。

[0190] 在另一个实施方案中,可以初步测试本发明抗体与治疗或体外诊断用途相关的结合活性。例如,可以使用下文实施例所述的流式细胞仪测定,来测试本发明的组合物。

[0191] 本发明还提供了使用人源化抗体或其片段作为药物的用途,和人源化抗体或其片段在制备用于治疗 CD19 介导的病症的药物中的用途。在其他实施方案中,本发明提供了人源化抗体或其片段,其用作为药物。本发明还提供了人源化抗体或其片段,用在治疗 CD19 介导的病症的方法中。CD19 介导的病症如上文所述。

[0192] 如前所述,本发明的人抗 CD19 抗体可以和一种或其它多种治疗剂共同施用,例如细胞毒性剂、放射毒性剂或免疫抑制剂。抗体可以与活性剂连接(作为免疫复合物)或者可以与活性剂分别施用。在后一种情况下(分别施用),可以在活性剂之前、之后或同时施用抗体,或者可以与其它已知的疗法共同施用抗体,所述疗法例如抗癌疗法,例如放射。

[0193] 对于施用抗体,剂量范围从约 0.0001 至 100mg/kg,更常见从 0.01 至 10mg/kg 的宿主体重。示例性的治疗方案需要每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 月一次或每 3 至 6 个月一次施用。通常在多种情况施用所述抗体。单次剂量之间的间隔可以是例如每周、每月、每三月或每年。间隔还可以是不规律的,通过测量血液的抗体水平与患者中的靶抗原提示。在一些方法中,调节剂量获得约 1-1000 μ g/ml 的血浆抗体浓度,而在一些方法中,约 25-300 μ g/ml。可选的,可以以持续释放的配方施用抗体,在此情况下需要较低的施用频率。剂量和频率根据患者中的抗体的半衰期而变化。施用的剂量和频率可以根据所述治疗是预防性还是治疗性而改变。在预防性应用中,在较长时间段中,以相对较不频繁的间隔,施用相对较低的剂量。一些患者在其余生中持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对较短的间隔施用相对较高的剂量,直到降低或终止疾病的进展。

[0194] 活性成分的实际剂量(即,本发明的药物组合物中的抗体)是可以改变的,从而获得活性成分的这样的量,对于特定的患者、组合物和施用模式,所述量有效的实现理想的治疗响应,而对患者没有毒性。选定的剂量水平取决于多种药物动力学因子,包括所使用的本发明特定组合物的活性、施用途径、施用时间、所使用的特定抗体的排泄速率、治疗的持续时间、与所使用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、年龄、性别、体重、病况、健康状态和受治患者之前的药物史等本领域普遍已知的因素。

[0195] “治疗有效量”的本发明的抗 CD19 抗体优选导致疾病症状严重程度减少、疾病无症状期的频率和持续期的增加,和/或预防由于病痛导致的损伤或残疾。例如,对于治疗肿瘤发生性病症(CD19⁺ 肿瘤),相对于未治疗的对象,“治疗有效量”优选抑制细胞生长或肿瘤生长至少约 20%,更优选至少约 40%,甚至更优选至少约 60%,仍然更优选至少约 80%。可以在预测人类肿瘤功效的动物模型系统中评估化合物抑制肿瘤生长的能力。可选

的,可以通过检验化合物抑制细胞生长的能力,来评估组合物的该特性,可以通过熟练的技术人员已知的测定在体外测量此类抑制作用。治疗有效量的治疗性化合物可以减小肿瘤尺寸,或者减轻对象的症状。本领域的普通技术人员将能够基于如下因素确定所述量,例如对象的尺寸、对象症状的严重程度,和所选定的特定组合物或施用途径。

[0196] 可以利用本领域已知的各种方法中的一种或多种,通过一种或多种施用途径,来施用本发明的抗体或组合物。如熟练的技术人员所理解的,施用的途径和/或方式将根据所需的结果而改变。优选的施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱的或其它不经肠道的施用途径,例如通过注射或输注。更优选的施用途径是静脉内或皮下的。本文中使用的词组“不经肠道的施用”意指除肠和局部施用以外的施用方式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、硬膜内、囊内、眶内 (intraorbital)、心内 (intracardiac)、皮内 (intradermal)、腹膜内 (intraperitoneal)、经气管的 (transtracheal)、皮下、表皮下 (subcuticular)、关节内 (intraarticular)、囊下 (subcapsular)、蛛网膜下 (subarachnoid)、脊柱内 (intraspinial)、硬膜外 (epidural) 和胸骨内 (intrasternal) 的注射和输注。可选的,可以通过非不经肠道的途径施用本发明的抗体,例如局部的、表皮的或粘膜的施用途径,例如鼻内、口服、阴道的、经直肠的、舌下的或局部的。

[0197] 制品和药盒

[0198] 在本发明的另一个实施方案中,提供了用于治疗 CD19 介导的病症的、包括本发明的人源化抗体或其片段、组合物或免疫缀合物的制品。制品可包括容器,和与容器相关联或在其上的标签或包装内置物。合适的容器包括例如瓶、管状瓶或注射器。可以用多种材料形成容器,例如玻璃或塑料。容器保留对治疗疾病有效的的组合物,可具有无菌的入口(例如,容器可以是静脉内用溶液包或管状瓶,具有可被皮下注射针头穿刺的瓶塞)。组合物中的至少一种活性剂是本文所述的人源化抗体。标签或包装内置物可指示所述组合物可用于治疗的选择的疾病,例如癌症。在一个实施方案中,标签或包装内置物可指示包括人源化抗体的所述组合物可用于治疗 CD19 介导的病症。

[0199] 此外,制品可包括 (a) 其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包括本文的人源化抗体,和 (b) 其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包括人源化抗体以外的治疗剂。本发明的这一实施方案中的制品可进一步包括包装内置物,其指示第一和第二组合物可组合的用于治疗 CD19 介导的疾病或病症。此类治疗剂可以是上述章节中描述的任何附属疗法(例如,血栓溶解剂、抗血小板剂、化疗剂、抗血管发生剂、抗激素化合物、保心药和/或哺乳动物免疫功能的调节剂,包括细胞因子)。可选的或额外的,制品可还包括包含药学可接受的缓冲液的第二(或第三)容器,例如抑菌性注射用水 (BWFI)、磷酸缓冲盐溶液、林格液 (Ringer's solution) 和葡萄糖溶液。还可包括其他对商业和用户观点而言理想的材料,包括其他的缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0200] 还落入本发明范围内的包括包含本发明的抗体、组合物或免疫缀合物和使用说明的药盒。药盒可进一步含有一种或多种其他试剂,例如免疫抑制剂、细胞毒性剂或放射毒性剂,或一种或多种其他的本发明的人源化抗体(例如,结合 CD19 中不同于第一人源化抗体的表位的人源化抗体,其具有补充活性)。

[0201] 材料的保藏

[0202] 下列材料保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124Braunschweig, Germany 中:

[0203] 于 2010 年 2 月 5 日保藏在 DSMZ 的微生物(大肠杆菌),具有登录号 DSM 23303,其包含分离的核酸,所述核酸包含如实施例 1 所述结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的轻链编码核酸序列。于 2010 年 2 月 5 日保藏在 DSMZ 的微生物(大肠杆菌),具有登录号 DSM 23302,其包含分离的核酸,所述核酸包含如实施例 1 所述结合人 CD19 的人源化 FMC63 变体的重链编码核酸序列。这些保藏都是根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约及其规程中的布达佩斯条约的条款进行的(布达佩斯条约)。

[0204] 不需进一步描述,可以相信本领域的普通技术人员可以利用上述说明和下列示例性实施例,制造和利用本发明的物质和实施要求保护的方法。下列工作实施例供促进本发明的实践所用,并非被视为对本发明其余内容的任何方式的限制。

实施例

[0205] 实施例 1:抗人 CD19 的小鼠单克隆 FMC63 抗体的人源化

[0206] 本文描述了人源化抗人 CD19 的鼠抗体 FMC63,包括人受体框架的选择、回复突变和基本保留和/或改善人 CDR 移植受体框架结合特性的突变。

[0207] FMC63 是鼠 IgG2a,从用人幼淋巴细胞白血病细胞系 JVM3 免疫的小鼠中分离的 κ 抗体(Zola H. 等人,(1991),*Immunol Cell Biol.*,69:411-22),其可变区是已知的且公众可获得的(重链 NCBI 登录号:CAA74659(SEQ ID NO:1);轻链 NCBI 登录号:CAA74660(SEQ ID NO:2))。测定抗原结合亲和力的方法是本领域普遍已知的,包括半最大结合测定、竞争测定和 Scatchard 印迹分析。

[0208] 设计改造的可变区

[0209] 选择人受体框架:使用同源性匹配来选择移植 FMC63CDR 的人受体框架。可使用数据库(例如,人和小鼠免疫球蛋白基因座的种系可变基因的数据库,VBASE2(Retter I. 等人,2005,*Nucleic Acids Res.*,33,Database issue D671-D674)或 Kabat 数据库(Johnson G. 等人,2000,*Nucleic Acids Res.*,28,第 214-218 页))或出版物(例如,Kabat 等人,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,1992)鉴别鼠重链和轻链 V 区所属的人亚族,并确定用作受体分子的最适人种系框架。在这些用作受体的亚族中选择 VH 和 VL 序列可基于序列同源性和/或 CDR1 和 CDR2 区的结构匹配,来帮助在移植后保留六个 CDR 的恰当的相对呈现。

[0210] 例如,VBASE2 数据库的使用提示 FMC63 的 κ 轻链是 $\kappa 1$ 亚族,因为在 FMC63VL 框架和人 κ 亚族 I 的成员之间鉴别了良好的同源性。对四种种系序列观察到了 CDR 和框架序列的最高同源性和同一性:IGKV1-5 * 03(VBASE2ID humIGKV087)(SEQ ID NO:3),IGKV1-27 * 01(VBASE2ID humIGKV106)(SEQ ID NO:4),IGKV1-39 * 01(VBASE2ID humIGKV115)(SEQ ID NO:5),和 IGKV1-12 * 01(VBASE2ID humIGKV094)(SEQ ID NO:6);其在达到 CDR3 的整个序列分别具有 70.4%、75%、76.1%和 72.7%的序列同一性,而在框架区分别具有 74.3%、78.6%、78.6%和 77.1%的序列同一性。因为 VBASE2 中不包括完整的 LCDR3 和框架 4 区,所以通过分析从健康的供体 B 细胞 mRNA 制备的互补 DNA(cDNA),来鉴别与人受体框架最匹配的 JK 区段序列,之后使用简并引物扩增,表 1 显示了 κ 同种型的免疫球蛋白轻链第一恒

定结构域。利用该方法,扩增的与 IGKV1-5 * 03(SEQ ID NO:3)、IGKV1-27 * 01(SEQ ID NO:4)、IGKV1-39 * 01(SEQ ID NO:5) 和 IGKV1-12 * 01(SEQ ID NO:6) 最匹配序列分别是:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

[0211] 表 1:

	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')
[0212]	GATCGGATCCACTGG TGATATTGTGATGAC YCAGWCTCC (SEQ ID NO: 70)	GATCGCGGCCGCACA CTCTCCCCTGTTGAA GCTCTT (SEQ ID NO: 71)

	种系可变区	扩增的可变区
[0213]	Hum IGKV 087 (SEQ ID NO: 3)	pAE18 VL-2a 克隆#39 (SEQ ID NO: 7)
	Hum IGKV 106 (SEQ ID NO: 4)	pAE18 VL-2a 克隆#40 (SEQ ID NO: 8)
	Hum IGKV 115 (SEQ ID NO: 5)	pAE18 VL-2a 克隆#43 (SEQ ID NO: 9)
	Hum IGKV 094 (SEQ ID NO: 6)	pAE18 VL-2a 克隆#44 (SEQ ID NO: 10)

[0214] 相似的, VBASE2 数据库的使用提示 FMC63 直到框架 3 的 VH 序列落入人 VH 亚族 III 中。在人 VH 亚族 III 中, FMC63 表现出与 IGHV3-33 * 01 (VBASE2-ID: humIGHV199) (SEQ ID NO: 11)、IGHV3-11 * 01 (VBASE2-ID: humIGHV175) (SEQ ID NO: 12)、IGHV3-30 * 18 (VBASE2-ID: humIGHV195) (SEQ ID NO: 13) 和 IGHV3-48 * 01 (VBASE2-ID: humIGHV031) (SEQ ID NO: 14) 的最高同源性;其在框架区和 CDR 区表现出高于 70.4% 的序列同源性。就轻链而言,鉴别相容的 JH 区段的资源是用简并引物扩增的从健康的供体 B 细胞 mRNA 制备的 cDNA, 和 IgM 重链第一恒定结构域 (表 2)。下列序列:SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 分别与 IGHV3-33 * 01 (VBASE2-ID: humIGHV199) (SEQ ID NO: 11)、IGHV3-11 * 01 (VBASE2-ID: humIGHV175) (SEQ ID NO: 12)、IGHV3-30 * 03 (VBASE2-ID: humIGHV195) (SEQ ID NO: 13) 和 IGHV3-48 * 01 (VBASE2-ID: humIGHV031) (SEQ ID NO: 14) 最接近。

[0215] 表 2:

	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')
[0216]	GATCGGATCCACTGGTG AGGTGCAGCTGGTGGA GTC (SEQ ID NO: 72)	GATCGCGGCCGCTGG AAGAGGCACGTTCTTT TCTTT (SEQ ID NO: 73)
	GATCGGATCCACTGGTC AGGTYCAGCTKGTGCA GTCTGG (SEQ ID NO: 113)	

[0217]

种系可变区	引物	扩增的可变区
Hum IGHV 199 (SEQ ID NO: 11)	SEQ ID NO: 72 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-3a 克隆#2 (SEQ ID NO: 15)
Hum IGHV 175 (SEQ ID NO: 12)	SEQ ID NO: 72 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-3a 克隆#5 (SEQ ID NO: 16)
Hum IGHV 195 (SEQ ID NO: 13)	SEQ ID NO: 113 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-1b 克隆#16 (SEQ ID NO: 17)
Hum IGHV 031 (SEQ ID NO: 14)	SEQ ID NO: 113 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-1b 克隆#20 (SEQ ID NO: 18)

[0218] 制备移植到人可变区上的初始 CDR

[0219] 将上文制备的人 VH 和 VL 片段用于开始人源化程序。cDNA 用作 CDR 移植的模板，使用重叠 PCR 装配提供基于下列重链和轻链的第一人源化候选物：VH2(SEQ ID NO:19)、VH5(SEQ ID NO:20)、VH16(SEQ ID NO:21)、VH20(SEQ ID NO:22)、VL39(SEQ ID NO:23)、VL40(SEQ ID NO:24)、VL43(SEQ ID NO:25) 和 VL44(SEQ ID NO:26)，其中用表 3 显示的 FMC63CDR 替换最初的 CDR。

[0220] 表 3 :FMC63CDR 区

	重链		轻链	
	氨基酸序列	SEQ ID NO:	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0221] CDR1	GVSLPDYGVS	27	RASQDISKYLN	30
CDR2	VIWGSETTY NSALKS	28	HTSRLHS	31
CDR3	HYYYGGSYA MDY	29	QQGNTLPYT	32

[0222] VH2、VH5、VH16 和 VH20 重链分别基于编码 SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18 的 cDNA,使用如表 4 和 5 所述的四片段装配 PCR 策略将 CDR 替换为 FMC63CDR。如表 6 和 7 所示,类似的策略也用于 VL39、VL40、VL43 和 VL44。

[0223] 对于重链,通过运行二次 PCR,亚克隆表 4 描述的 PCR 扩增产物,使用衔接子引物(正义引物 HindIII VJ2C(SEQ ID NO :93);和反义引物 SalI 衔接子(SEQ ID NO :92))在可变结构域 cDNA 的 3' 端添加 SalI 位点(见下文)。表 6 所述的扩增允许指导 κ 链克隆到哺乳动物细胞表达载体中(描述如下)。在该例子中,使用 BamHI 和 NotI 位点策略,产物含有可变区以及全长恒定区 κ 结构域,并被克隆到哺乳动物细胞表达载体中。

[0224] 表 4:概述用于构建移植第 1CDR 的重链可变区的模板和引物

[0225]

构建体	模板	片段 1 PCR 引物	片段 2 PCR 引物	片段 3 PCR 引物	片段 4 PCR 引物
移植 VH2/FMC63 的 (SEQ ID NO: 19)	pAE18 VH-3a 克隆#2 (SEQ ID NO: 15)	CMV-IE 正向 (SEQ ID NO: 74) 和	VH2 mCDR1 接头正向 (SEQ ID NO: 77)	VH2 mCDR2 接头正向 (SEQ ID NO: 79)	VH2 mCDR3 接头正向 (SEQ ID NO: 81)

[0226]

		VH2 mCDR1 接头反向 (SEQ ID NO: 76)	和 VH2 mCDR2 接头反向 (SEQ ID NO: 78)	和 VH2 mCDR3 接头反向 (SEQ ID NO: 80)	和 BGH 反向 (SEQ ID NO: 75)
移植 VH5/FMC63 的 (SEQ ID NO: 20)	pAE18 VH-3a 克隆#5 (SEQ ID NO: 16)	CMV-IE 正向 (SEQ ID NO: 74) 和 VH5 mCDR1 接 头反向 (SEQ ID NO: 82)	VH5 mCDR1 接头正向 (SEQ ID NO: 83) 和 VH20 mCDR2 接头反向 (SEQ ID NO: 89)	VH5 mCDR2 接头正向 (SEQ ID NO: 84) 和 VH5 mCDR3 接头反向 (SEQ ID NO: 85)	VH5 mCDR3 接头正向 (SEQ ID NO: 86) 和 BGH 反向 (SEQ ID NO: 75)
VH16/FMC63 grafted (SEQ ID NO: 21)	pAE18 VH-1b 克隆#16 (SEQ ID NO: 17)	CMV-IE 正向 (SEQ ID NO: 74) 和 VH5 mCDR1 接头反向 (SEQ ID NO: 82)	VH2 mCDR1 接头正向 (SEQ ID NO: 77) 和 VH2 mCDR2 接头反向 (SEQ ID NO: 78)	VH2 mCDR2 接头正向 (SEQ ID NO: 79) 和 VH16 mCDR3 接头反向 (SEQ ID NO: 87)	VH2 mCDR3 接头正向 (SEQ ID NO: 81) 和 BGH 反 向 (SEQ ID NO: 75)
移植 VH20/FMC63 的 (SEQ ID NO: 22)	pAE18 VH-1b 克隆#20 (SEQ ID NO: 18)	CMV-IE 正向 (SEQ ID NO: 74) 和	VH2 mCDR1 接头正向 (SEQ ID NO: 77)	VH20 mCDR2 接头正向 (SEQ ID NO: 90)	VH2 mCDR3 接头正向 (SEQ ID NO: 81)

[0227]

		VH20 mCDR1 接头反向 (SEQ ID NO: 88)	和 VH20 mCDR2 接头反向 (SEQ ID NO: 89)	和 VH20 mCDR3 接头反向 (SEQ ID NO: 91)	和 BGH 反向 (SEQ ID NO: 75)
--	--	--	--	--	---

[0228] 表 5 :用于构建移植选定的人重链第 1CDR 的可变区的引物序列

[0229]

引物	序列 (5'→3')
CMV-IE 正向 (SEQ ID NO: 74)	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
BGH 反向 (SEQ ID NO: 75)	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
VH2 mCDR1 接头反向 (SEQ ID NO: 76)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA CGC TGC ACA GGA GAG TCT C
VH2 mCDR1 接头正向 (SEQ ID NO: 77)	GGC GTG AGC CTG CCC GAC TAC GGC GTG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GG
VH2 mCDR2 接头反向 (SEQ ID NO: 78)	GGC GCT GTT GTA GTA GGT TGT CTC GGA GCC CCA GAT CAC TGC CAC CCA CTC CAG CCC CTT G
VH2 mCDR2	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT

[0230]

接头正 向 (SEQ ID NO: 79)	TCC
VH2 mCDR3 接头反 向 (SEQ ID NO: 80)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TGT GGT ACA GTA ATA CAC GGC
VH2 mCDR3 接头正 向 (SEQ ID NO: 81)	CAC TAC TAC TAC GGC GGC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
VH5 mCDR1 接头反 向 (SEQ ID NO: 82)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA GGC TGC ACA GGA GAG TCT C'
VH5 mCDR1 接头正 向 (SEQ ID NO: 83)	GGC GTG AGC CTG CCC GAC TAC GGC GTG AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG
VH5 mCDR2 接头正 向 (SEQ ID NO: 84)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC
VH5 mCDR3 接头反 向 (SEQ ID	GTA GTC CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG CCC CGC ACA GTA ATA AAC GGC

[0231]

NO: 85)	
VH5 mCDR3 接头正 向 (SEQ ID NO: 86)	CAC TAC TAC TAC GGC GGC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC
VH16 mCDR3 接头反 向 (SEQ ID NO: 87)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TCT CGC ACA GTA ATA CAC GGC
VH20 mCDR1 接头反 向 (SEQ ID NO: 88)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA GGC TAC ACA GGA GAG TCT C
VH20 mCDR2 接头反 向 (SEQ ID NO: 89)	GGC GCT GTT GTA GTA GGT TGT CTC GGA GCC CCA GAT CAC TGA AAC CCA CTC CAG CCC CTT C
VH20 mCDR2 接头正 向 (SEQ ID NO: 90)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
VH20 mCDR3 接头反 向 (SEQ ID NO: 91)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TCT CGC ACA GTA ATA CAC AGC
SaII 衍 接子	GATC GTCGAC GC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GG

[0232]

(SEQ ID NO: 92)	
HindIII VJ2C 正向 (SEQ ID NO: 93)	GATCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTC

[0233] 表 6 :概述用于构建移植第 1CDR 的轻链可变区的模板和引物

[0234]

构建体	模板	片段 1 PCR 引物	片段 2 PCR 引物	片段 3 PCR 引物	片段 4 PCR 引物
移植 VL39/FMC63 的 (SEQ ID NO: 23)	pAE18 VL-2a 克隆#39 (SEQ ID NO: 7)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) 和 VL43 mCDR1 接头反向 (SEQ ID NO: 101)	VL43 mCDR1 接头正向 (SEQ ID NO: 102) 和 VL43 mCDR2 接头反 向 (SEQ ID NO: 103)	VL39 mCDR2 接头正 向 (SEQ ID NO: 94) 和 VL39 mCDR3 接头反 向 (SEQ ID NO: 95)	VL39 mCDR3 接头正向 (SEQ ID NO: 96) 和 NotI Kappa 反向 (SEQ ID NO: 112)
移植 VL40/FMC63 的 (SEQ ID NO: 24)	pAE18 VL-2a 克隆#40 (SEQ ID NO: 8)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) 和 VL43 mCDR1 接头反向 (SEQ ID NO: 101)	VL43 mCDR1 接头正 向 (SEQ ID NO: 102) 和 VL40 mCDR2 接头反	VL40 mCDR2 接头正 向 (SEQ ID NO: 98) 和 VL40 mCDR3 接头反	VL40 mCDR3 接头正 向 (SEQ ID NO: 100) 和 NotI Kappa 反向

[0235]

			向 (SEQ ID NO: 97)	向 (SEQ ID NO: 99)	(SEQ ID NO: 112)
移 植 VL43/FMC63 的 (SEQ ID NO: 25)	pAE18 VL-2a 克隆#43 (SEQ ID NO: 9)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) 和 VL43 mCDR1 接头 反向 (SEQ ID NO: 101)	VL43 mCDR1 接头 正 向 (SEQ ID NO: 102) 和 VL43 mCDR2 接头 反 向 (SEQ ID NO: 103)	VL43 mCDR2 接头 正 向 (SEQ ID NO: 104) 和 VL43 mCDR3 接头 反 向 (SEQ ID NO: 105)	VL43 mCDR3 接头 正 向 (SEQ ID NO: 106) 和 NotI Kappa 反向 (SEQ ID NO: 112)
移 植 VL44/FMC63 的 (SEQ ID NO: 26)	pAE18 VL-2a 克隆#44 (SEQ ID NO: 10)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) 和 VL44 mCDR1 接头 反向 (SEQ ID NO: 107)	VL43 mCDR1 接头 正 向 (SEQ ID NO: 102) 和 VL44 mCDR2 接头 反 向 (SEQ ID NO: 108)	VL44 mCDR2 接头 正 向 (SEQ ID NO: 109) 和 VL44 mCDR3 接头 反 向 (SEQ ID NO: 110)	VL44 mCDR3 接头 正 向 (SEQ ID NO: 111) 和 NotI Kappa 反向 (SEQ ID NO: 112)

[0236] 表 7 :用于构建移植选定的人轻链第 1CDR 的可变区的引物序列

[0237]

引物	序列 (5'→3')
VL39 mCDR2 接头	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC

[0238]

正向 (SEQ ID NO: 94)	
VL39 mCDR3 接头 反向 (SEQ ID NO: 95)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG GCA GTA ATA AGT TGC AAA ATC ATC
VL39 mCDR3 接头 正向 (SEQ ID NO: 96)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG G
VL40 mCDR2 接头 反向 (SEQ ID NO: 97)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG GTT AGG AAC
VL40 mCDR2 接头 正向 (SEQ ID NO: 98)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCT CGG TTC AGC GGC
VL40 mCDR3 接头 反向 (SEQ ID NO: 99)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA GTA ATA AGT TGC AAA ATC TTC
VL40 mCDR3 接头 正向 (SEQ ID NO: 100)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
VL43 mCDR1 接头 反向 (SEQ ID NO: 101)	GTT CAG GTA CTT GCT GAT GTC CTG GCT GGC CCG GCA AGT GAT GGT GAC TCT GTC TCC

VL43 mCDR1 接头 正向 (SEQ ID NO: 102)	CGG GCC AGC CAG GAC ATC AGC AAG TAC CTG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG
VL43 mCDR2 接头 反向 (SEQ ID NO: 103)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG CTT AGG GGC
VL43 mCDR2 接头 正向 (SEQ ID NO: 104)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC
VL43 mCDR3 接头 反向 (SEQ ID NO: 105)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA GTA GTA AGT TGC AAA ATC TTC
VL43 mCDR3 接头 正向 (SEQ ID NO: 106)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG G
VL44 mCDR1 接头 反向 (SEQ ID NO: 107)	GTT CAG GTA CTT GCT GAT GTC CTG GCT GGC CCG ACA AGT GAT GGT GAC TCT GTC TCC
VL44 mCDR2 接头 反向 (SEQ ID NO: 108)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG GTT AGG GGC
VL44 mCDR2 接头 正向	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC

[0239]

[0240]

(SEQ ID NO: 109)	
VL44 mCDR3 接头 反向 (SEQ ID NO: 110)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA ATA ATA AGT TGC AAA ATC TTC
VL44 mCDR3 接头 正向 (SEQ ID NO: 111)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTT GGC CAG GGG ACC AAG TTG G
NotI Kappa 反向 (SEQ ID NO: 112)	GATC GCGGCCGC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC

[0241] 将改造的重链和轻链编码 DNA 序列连接到独立的载体中,所述载体是基于携带 CMV 启动子和牛生长激素多聚腺苷酸信号的修饰的 pREP4 (Invitrogen, CA, USA) 载体的。通过使用 BamHI 和 BsiWI 限制性位点,在 κ 轻链恒定结构域 eDNA 之前连接可变 κ 轻链 eDNA 片段,轻链特异性载体允许 κ 同种型轻链的表达;同时,改造了重链特异性载体,使用 BamHI 和 SalI 限制性位点,在编码 γ 1、铰链、 γ 2 和 γ 3 恒定结构域的 eDNA 之前,连接可变重链 eDNA 片段。在重链和轻链表达载体中,分泌是由含 BamHI 位点的鼠 VJ2C 前导肽驱动的。应注意,BsiWI 位点位于 κ 恒定结构域中;同时,SalI 位点位于 C γ 1 结构域中。

[0242] 为了瞬时表达免疫球蛋白候选物,使用聚乙烯亚胺 (PEI),将等量的重链和轻链载体共转染到适应悬浮的 HEK-EBNA 细胞 (ATCC-CRL-10852) 中。通常,用含有 50 μ g 编码重链的表达载体和 50 μ g 编码轻链的表达载体的 DNA-PEI 混合物,转染 100ml 密度为 0.8-1.2 百万细胞/ml 的细胞悬浮液。当编码抗体基因的重组表达载体被导入宿主细胞中时,进一步培养细胞为期 4 至 5 天来生产抗体,以允许分泌到培养基 (EX-CELL 293, HEK293- 无血清培养基, Sigma, Buchs, Switzerland) 中,所述培养基补充了 0.1% pluronic acid、4mM 谷氨酰胺和 0.25 μ g/ml 遗传霉素。然后,使用重组的蛋白 A streamline 基质 (GE, Switzerland),从无细胞上清液中纯化抗体,并在测定前缓冲液交换为磷酸缓冲盐溶液。

[0243] 人源化对策是基于初始的 4 种移植的重链和轻链 (上文) 的,其以成对的方式组合,衍生出 16 种初始的全长免疫球蛋白候选物。通过在 B 细胞淋巴瘤细胞系 (FACS) 上的半最大结合测定,和与嵌合版本的 FMC63 相比较 (这是为了标准化抗人 Fc PE 标记的检测抗体的染色水平,如实施例 2 所述),来评估这些免疫球蛋白的抗原结合亲和力。根据该初步工作,含有 VH16 (SEQ ID NO:21) 或 VH20 (SEQ ID NO:22) 的免疫球蛋白候选物在 FACS 实验中表现出与 Raji 细胞的最佳结合,如图 1A 和 1B 所示。由 VH16 重链和轻链 VL43 配对组成的抗体在瞬时转染中具有最优的表达水平,它的 FAB 片段具有最优的解链温度,因此被

选为用于进一步回复突变和合理改造,如表 8 所示。

[0244] 表 8:移植第 1CDR 的抗体的 IgG 瞬时表达水平和 FAB 稳定性

[0245]

抗体	表达 (mg/L)	TmFab(°C)
嵌合 FMC63	48	84.27
VH2/VL39	11	78.78
VH2/VL40	23	76.55
VH2/VL43	13	73.17
VH2/VL44	21	78.27
VH5/VL39	5	76.08
VH5/VL40	9	ND
VH5/VL43	19	76.76
VH5/VL44	12	74.81
VH16/VL39	8	71.67
VH16/VL40	11	71.81
VH16/VL43	20	83.54
VH16/VL44	7	85.16
VH20/VL39	11	82.41
VH20/VL40	24	79.46
VH20/VL43	37	79.67
VH20/VL44	26	82.00

[0246] 人框架的回复突变

[0247] 由于直接移植 FMC63 小鼠抗体的 CDR 导致人受体具有低的结合特性,所以理想的是在一些位置上将框架内的某些残基突变回鼠残基。被称为回复突变的该过程是单克隆抗体人源化中最不可预测的程序,必需鉴别亲本抗体中需要保留的关键框架残基,从而基本保留亲本抗体的结合特性与此同时最小化所获得抗体的潜在免疫原性。表 9 和 10 和图 2A 和 2B 显示了可影响 CDR 构象的残基 (Kabat 编号),其被选为回复突变为鼠残基的潜在候选。

[0248] 表 9 :比较 FMC63 和人受体轻链框架区

VH			
Kabat 位置	FMC63	VH16	VH20
37	I	V	V
42	R	G	G
48	L	V	V
49	G	A	S
67	L	F	F
71	K	R	R
78	V	L	L
94	K	R	R

[0249]

[0250] 表 10 :比较 FMC63 和人受体重链框架区

VL		
Kabat 位置	FMC63	VL39,VL40, VL43,VL44
44	V	P,P,P,P
71	Y	F,F,F,F
87	F	Y,Y,Y,Y

[0251]

[0252] 在重链的 8 个可能的回复突变中,由于其保守的性质,放弃了位置 37、48 和 49 的改变。因此制造了 4 种改造版的 VH16,并以成对的方式与 VL43 的所有 3 种回复突变组合。此外,将改造的变体与亲本 VH16 和 VL43 配对,研究每种单回复突变的影响。研究了共计 24 种全长免疫球蛋白候选物。相比 VH16 序列,5 种重链变体具有下列单点突变 :G42R、F67L、R71K、L78V 和 R94K ;同时,相比 VL43,3 种轻链变体具有 P44V、F71Y 和 Y87F。

[0253] 根据 FACS 实验 (如实施例 2 所述)、瞬时表达水平和 FAB 稳定性测量,可知回复突变重链 R94K 和 / 或轻链 P44V 大幅度的增加与 Raji 细胞或 NALM-6 细胞的结合,同时改善了表达水平,并维持良好的 FAB 稳定性,如表 11 和 12 所示。仅这两个位置就恢复了亲本 FMC63 抗体约一半的结合力。

[0254] 表 11 :人源化回复突变的抗 CD19 抗体在 Raji 和 NALM-6 肿瘤细胞系上的 FACS 染色。流式细胞仪测量的与抗体中点荧光 (MPF) 对应的值 (在 Raji 和 NALM-6 细胞上的测量分别表示为 Raji 和 NALM-6) 表示为针对 FMC63 嵌合抗体观察到的值的百分比。

[0255]

	VL43		VL43-P44V		VL43-F71Y		VL43-Y87F	
	Raji	NALM-6	Raji	NALM-6	Raji	NALM-6	Raji	NALM-6
VH16	7.42	3.29	9.72	6.05	11.29	NA	10	NA
VH16-G42R	NA	3.48	8.33	NA	NA	3.97	8.43	3.65
VH16-F67L	NA	2.40	NA	2.37	6.54	NA	4.35	NA
VH16-R71K	4.43	NA	6.93	NA	NA	2.67	4.19	NA
VH16-L78V	10.77	NA	25.93	10.95	12.28	NA	17.95	NA
VH16-R94K	27.06	14.38	52.87	32.86	41.82	23.47	31.82	NA

[0256] 表 12 :人源化回复突变的抗 CD19 抗体的 IgG 瞬时表达水平和 FAB 稳定性

[0257]

	VL43		VL43-P44V		VL43-F71Y		VL43-Y87F	
	FAB Tm (°C)	瞬时表达水平 (mg/l)	FAB Tm (°C)	瞬时表达水平 (mg/l)	FAB Tm (°C)	瞬时表达水平 (mg/l)	FAB Tm (°C)	瞬时表达水平 (mg/l)
VH16	83.54	20	81.04	29	83.9	25	82.97	24
VH16-G42R	82.59	48	79.84	20	83.08	48	82.51	34
VH16-F67L	82.92	46	79.92	23	83.34	29	82.22	22
VH16-R71K	83.92	45	80.9	52	83.67	48	83.34	39
VH16-L78V	87.87	36	85.87	42	87.87	44	86.68	42
VH16-R94K	82.75	63	80.10	42	82.88	50	82.22	38

[0258] 种系化

[0259] 作为人源化抗体的受体框架,种系框架一般优于个体的成熟抗体框架,因为它们缺少可能降低免疫原性程度的体细胞突变。利用根据 VBASE2 种系序列设计的简并引物,从健康供体 B 细胞 mRNA 中获得 VH16,该程序提供了尚未遭遇过任何抗原的抗体。然而,由于真正首次用于实验的抗体的频率严重取决于 B 细胞来源,使用上述程序也可以观察到突变 (Klein U. 等人,1997,Blood 89,第 1288-1298 页)。VH16 和 VL43 具有低含量的被回复突变为种系的非种系残基,这些改变是 VH16-Q6E、VL43-V3Q 和 VL43-T7S,如表 13 所示。

[0260] 表 13:人源化回复突变/种系化的抗 CD19 抗体在 Raji 肿瘤细胞系上的 FACS 染色。流式细胞仪测量的与抗体中点荧光 (MPF) 对应的值 (表示为 Raji) 表示为针对 FMC63 嵌合抗体观察到的值的百分比。还表示了人源化回复突变/种系化的抗 CD19 抗体的 IgG 瞬时表达水平和 FAB 稳定性。

[0261]

	VL43			VL43-V3Q / T7S		
	Raji	瞬时表达水平 (mg/L)	FAB Tm (°C)	Raji	瞬时表达水平 (mg/L)	FAB Tm (°C)
VH16	7.14	20	83.54	4.93	28	83.51
VH16-R94K	26.79	60	82.75	27.78	13.5	82.36
VH16-Q6E	ND	30	83.12	5.68	36	83.46

[0262] 发现所有的种系改变都对 VH16-VL43 抗体没有影响,不论是其亲和性还是其 FAB 稳定性,并且仅显著增加了其瞬时的表达水平。之后,将在位置 VL43-V3Q 和 VL43-T7S 具有种系残基的 VH16-VL43 变体用于理性设计的亲和力改善 (下文)。

[0263] 通过理性设计和 CDR 改造的回复突变的人受体的亲和力改善

[0264] 酪氨酸突变体:FMC63CDR 具有高酪氨酸含量:重链 CDR1 (位置 32)、重链 CDR2 (位置 58 和 59)、重链 CDR3 (位置 96、97、98 和 100b)、轻链 CDR1 (位置 32),和轻链 CDR3 (位置

96)。特别是重链 CDR3 中的 4 个酪氨酸残基 (Y96、Y97、Y98 和 Y100b)，和在重链 CDR1 和轻链 CDR1 中可见的两个其他的酪氨酸残基，都在位置 32。这些残基可能定义了与人 CD19 分子假设的相互作用结合位点，因为除了它们的疏水性质外，事实上大部分这类残基都是重链 CDR3 的部分，所述 CDR3 是最重要的 CDR，通常决定特异性，所述残基还在 VH16-R94K/VL433D 模型中显著的突出在抗体结合位点平面的外侧。综合考虑，这些观察结果允许鉴别重链 CDR3 残基 96、97、98、100b 和轻链 CDR1 残基 32 作为理性的亲和力改善的候选物。酪氨酸残基是独特的，因为分别通过其芳香环和羟基，它们具有双重的疏水和极性性质。因此，将上述残基突变为苯丙氨酸，增加疏水性，探测在这些位置上极性对比疏水性含量的重要性。在重链 R94K 突变环境下的苯丙氨酸突变体测量显示，重链突变体 32、97、98 以及轻链突变体 32 优于亲本分子 VH16-R94K/VL43，其中重链突变体 Y97F 具有嵌合 FMC63 的 72.8% 的亲和力，如表 14 所示。

[0265] 表 14：人源化回复突变 / 亲和力成熟的抗 CD19 抗体在 Raji 肿瘤细胞系上的 FACS 染色。流式细胞仪测量的与抗体中点荧光 (MPF) 对应的值 (表示为 Raji) 表示为针对 FMC63 嵌合抗体观察到的值的百分比。还表示了人源化回复突变 / 亲和力成熟的抗 CD19 抗体的 IgG 瞬时表达水平和 FAB 稳定性。

抗体	相对 Raji FACS 染色	瞬时表达 (mg/L)	FAB T _m (°C)
VH16 R94K Y32F VL43	62.5	17	82.51
VH16 R94K Y96F VL43	5.36	14	83.53
VH16 R94K Y97F VL43	72.82	17	81.53
VH16 R94K Y98F VL43	34.09	10	81.91
VH16 R94K Y100bF VL43	27.78	24	82.92
VH16 R94K VL43 Y32F	39.47	25	82.56

[0267] 轻链——Pro 44 突变体：轻链 P44 位于重链和轻链交界处的底部，该位置可以解释当回复突变为缬氨酸时极大的亲和力改善。在位置 44 探讨了 2 种其他的疏水性氨基酸以可能协调 (或更好地调节) 轻链和重链之间的交界：在 VH16-R94K 变体背景中构建了异亮氨酸和亮氨酸变体，如表 15 所示。亲和力和稳定性测量揭示，在位置 44，异亮氨酸优于缬氨酸回复突变，而变为亮氨酸仅提供了轻微的改变，尽管亮氨酸是更合乎逻辑的选择。

[0268] 表 15：人源化回复突变 / 亲和力成熟的抗 CD19 抗体在 Raji 肿瘤细胞系上的 FACS 染色。流式细胞仪测量的与抗体中点荧光 (MPF) 对应的值 (表示为 Raji) 表示为针对 FMC63 嵌合抗体观察到的值的百分比。还表示了人源化回复突变 / 亲和力成熟的抗 CD19 抗体的 IgG 瞬时表达水平和 FAB 稳定性。

[0269]

抗体	相对 Raji FACS 染色	瞬时表达 (mg/L)	FAB T _m (°C)
VH16R94K VL43P44I	69.44	17	81.37
VH16R94K VL43P44L	37.50	18	80.10

[0270] 去除潜在的脱酰胺作用位点：脱酰胺作用是抗体降解的主要途径。Asn 脱酰胺作

用为 Asp 是高度序列依赖性的,发生在 CDR 中已知或预测是柔性的蛋白质区域 (Bischoff 和 Kolbe (Journal of Chromatography B, 662 (1994), 261-278); 这通常涉及位于 CDR 中的 Asn 残基。在 FMC63 轻链的 CDR3 中, 鉴别出位置 91 至 93 (GNT) 的天冬酰胺脱酰胺作用的高可能性。因此, 为了阻止假设的脱酰胺作用, 在 VH16-R94K 重链背景中探讨下列改变: VL43-N92A、VL43-T93V 和 VL-43-T93A, 如表 16 所示。发现, N92A 和 T93A 都维持了结合亲和力。还发现 N92A 变体具有改善的 FAB 稳定性。

[0271] 表 16 : 人源化回复突变 / 去除脱酰胺作用位点的抗 CD19 抗体在 Raji 肿瘤细胞系上的 FACS 染色。流式细胞仪测量的与抗体中点荧光 (MPF) 对应的值 (表示为 Raji) 表示为针对 FMC63 嵌合抗体观察到的值的百分比。还表示了人源化回复突变 / 去除脱酰胺作用位点的抗 CD19 抗体的 IgG 瞬时表达水平和 FAB 稳定性。

抗体	相对Raji FACS染色	瞬时表达(mg/L)	FAB Tm (°C)
VH16 VL43	7.14	20	83.54
VH16 R94K VL43	26.79	60	82.36
VH16 R94K VL43 N92A	25.86	33	84.09
VK16 R94K VL43 T93V	17.44	34	82.43
VH16 R94K VL43 T93A	34.09	35	82.81

[0273] 在位置 F71 进行了 VL43 人受体的其他改良。VH16R94K VL43F71H (SEQ ID NO :61)、VH16R94K VL43F71S (SEQ ID NO :62) 和 VH16R94K VL43F71T (SEQ ID NO :63) 与 Raji 的结合活性与 VH16R94KVL43 的结合活性相似。

[0274] 组合回复突变和理性设计的突变

[0275] 为了进一步增加与 Raji 细胞的结合, 在系统性方法中组合回复突变和理性设计的突变, 其中测试了有限数量的组合。将在重链和轻链中从酪氨酸转变为苯丙氨酸中鉴别的最改良的突变 (上文) 与轻链的改变 P44I 和 N92A, 以及种系改变 V3Q 和 T7S 组合。

[0276] 虽然 CDR 改变通常对亲和力具有附加的影响, 当这些 CDR 改变与影响框架的突变组合时, 其结果是不可预测的。表 17 显示了组合种系、框架、回复和 CDR 突变的 VH16/VL43 变体的相对 FACS 染色。发现将重链 CDR 改变 Y32F 和 Y97F 与回复突变 R94K 组合, 导致结合的丧失, 而 Y32F 与重链回复突变 R94K 和轻链改变 P44I 和 N92A 组合, 极大的改善了结合, 按照我们的测量手段, 这获得了染色优于 FMC63 嵌合体的相对中点滴度。另一种有利的组合是在重链回复突变 R94K 条件下的重链 CDR 突变 Y100BF 和 Y32F, 和轻链改变 V3Q、T7S、Y32F、P44I 和 N92A。

[0277] 表 17 : 人源化回复突变 / 种系化 / 亲和力成熟 / 去除脱酰胺作用位点的抗 CD19 抗体在 Raji 肿瘤细胞系上的 FACS 染色。流式细胞仪测量的与抗体中点荧光 (MPF) 对应的值 (表示为 Raji) 表示为针对 FMC63 嵌合抗体观察到的值的百分比。

[0278]

VL43 VH16	V3Q/T7S/ N92A	V3Q/T7S/ Y32F/N92A	V3Q/T7S/ P44I/N92A	V3Q/T7S/ Y32F/P44I/N92A
R94K	18.18	低饱和	83.33	111.11
Y32F/R94K	58.82	低饱和	133.33	低饱和
R94K/Y97F	低饱和	无结合	NA	低饱和
R94K/Y100 _B F	NA	NA	101.01	144.93
Y32F/R94K/Y97F	16.95	无结合	低饱和	6.67

[0279] 展现出高结合活性的组合还保留了高的瞬时表达水平（表 18）和高的 FAB 片段热稳定性（表 19）。

[0280] 表 18：人源化回复突变 / 种系化 / 亲和力成熟 / 去除脱酰胺作用位点的抗 CD19 抗体的 IgG 瞬时表达水平。

[0281]

VL43 VH16	V3Q/T7S/ N92A	V3Q/T7S/ Y32F/N92A	V3Q/T7S/ P44I/N92A	V3Q/T7S/ Y32F/P44I/N92A
R94K	15	45	47	34
Y32F/R94K	6.5	25	26	18
R94K/Y97F	23	31	25	22
R94K/Y100 _B F	NA	NA	NA	32
Y32F/R94K/Y97F	20	32	26	24

[0282] 表 19：人源化回复突变 / 种系化 / 亲和力成熟 / 去除脱酰胺作用位点的抗 CD19 抗体的 FAB 稳定性（°C）。

[0283]

VL43 VH16	V3Q/T7S/ N92A	V3Q/T7S/ Y32F/N92A	V3Q/T7S/ P44I/N92A	V3Q/T7S/ Y32F/P44I/N92A
R94K	84.29	84.34	83.13	83.31
Y32F/R94K	84.45	84.31	83.21	83.39
R94K/Y97F	83.92	83.96	82.9	83.04
R94K/Y100 _B F	NA	NA	NA	83.42
Y32F/R94K/Y97F	83.93	83.96	82.77	83.01

[0284] 实施例 2：CD19 抗体与 B 细胞来源的肿瘤细胞系的结合：流式细胞仪分析

[0285] 通过流式细胞仪评估 CD19 人源化单克隆抗体与 Raji 肿瘤细胞（人伯基特淋巴瘤，DSMZ ACC319）、NALM-6（人 B 细胞前体白血病，DSMZACC128）和 SU-DHL-6（人 B 细胞淋巴瘤，DSMZ ACC572）（所有的细胞系都来自 DSMZ Braunschweig, Deutschland）的结合。用系列稀释的各种人源化单克隆抗体孵育细胞。使用不相关的人 IgG1 作为阴性对照。洗涤细胞，并用藻红蛋白标记的（PE）抗人二抗（eBioscience, CA, USA）检测和用流式细胞仪分析。为了确保在人源化候选物和亲本鼠抗体之间可比较的染色水平，使用嵌合的 FMC63 作为标准，即，由如 SEQ ID NO：68 所示与人 IgG1 重链恒定结构域融合的 FMC63 鼠重链可变结构域，和如 SEQ ID NO：69 所示与 κ 恒定结构域融合的鼠轻链可变结构域组成的抗体。表 11、13-17 显示了与 Raji 或 NALM-6 结合的结果，图 3 显示了与 SU-DHL-6 细胞系结合的结果。图 3 中的所有结果是通过细胞染色的平均荧光强度（MFI）测量的。根据 MFI 对抗体浓

度的曲线,使用软件 GraphPad Prism 5(CA, USA) 计算每种抗 CD19 人源化抗体的中点荧光 (MPF) 值。剂量响应曲线的 MPF 表示了观察到 50%最大染色时的抗体浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。因而,具有与细胞更好的结合活性的抗体具有更低的 MPF ($\mu\text{g/ml}$)。在表 11、13-17 中,值表示嵌合 FMC63 和抗 CD19 人源化变体之间的相对 MPF,如下计算: $[1/(\text{MPF 嵌合 FMC63}/\text{MPF 抗 CD19 人源化抗体})] \times 100$ 。百分比越高,抗体的结合活性越好。

[0286] 图 3 显示,随着 VH16/VL43 抗体经过不同的人源化步骤成为 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 抗体,对 SU-DHL-6 细胞的亲和力大幅度改善。后者达到了与 FMC63 嵌合体相似的和 B 细胞的强亲和力。FMC63 人源化抗体与细胞的亲和力改善是突变的直接结果,所述突变基本保留和 / 或改善了如上所述移植人 CDR 的受体框架的结合特性。

[0287] 实施例 3:抗 CD19 人抗体与 Raji 肿瘤细胞的 SCATCHARD 结合分析

[0288] 人源化抗体与 Raji-B 肿瘤细胞的 Scatchard 结合分析

[0289] 可以用饱和结合曲线确定抗体与它的靶的恒定的结合亲和力。在平衡时,与其结合位点结合和游离的抗体的量是解离结合常数 K_d 的指标。通常,对于一个单结合位点,结合 / 游离比结合抗体的比例具有线性相关,斜率对应于结合常数 K_d 的倒数。

[0290] 用荧光染料铕 (Eu^{3+}) (PerkinElmer, MA, USA) 标记测试的抗体。 Eu^{3+} 提供了定量与细胞结合的抗体分子以及游离的抗体分子的量的可能。使用时间分辨荧光,通过 Eu^{3+} 进行选择的人源化候选物对 Raji 细胞结合的饱和。为了证实在没有 Eu^{3+} 染料与细胞表面非特异性行为的条件下, Eu^{3+} 标记的候选物的结合特异性,还用 Eu^{3+} 标记了阴性的同种型人 IgG1。

[0291] 如实施例 2 所述,将 Raji 细胞生长在补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)、2mM UltraGlutamine1 (Lonza, Verviers, Belgium) 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 的 RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 中。用相同的培养基洗涤细胞,并调节至 1×10^6 细胞 / ml 的终浓度。在 U 形底的 96 孔板中种植 $100 \mu\text{l}$ 体积的 Raji 细胞。将系列稀释的 Eu^{3+} 标记抗体制备成 PBS-2.5% FBS-0.05% 叠氮化钠 (NaN_3),放入分离的 96 孔板中,冷却至 4°C 。然后,将 $100 \mu\text{l}$ 体积各种 Eu^{3+} 标记抗体的稀释液转移到 Raji 细胞中,对应 13.3nM 至 6.5pM 的 Eu^{3+} 标记抗体的最终稀释范围。在冰上,用 Eu^{3+} 抗体孵育细胞 15 分钟,达到平衡。通过将等分试样的无细胞上清液 (根据抗体浓度经验的调节体积;在 1300RPM 离心细胞 2min) 转移至含 $100 \mu\text{l}$ 的 Delfia 溶液 (PerkinElmer, MA, USA; Eu^{3+} 荧光的增强剂) 的新鲜平板中,来测量游离的 Eu^{3+} 标记抗体的量。为了确保完全去除上清液,在 1300RPM 离心细胞 2min。在第二次离心后,抛弃上清液,用 $200 \mu\text{l}$ 冷的结合缓冲液 (PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3) 洗涤细胞 2 次。将细胞沉淀重悬在 $100 \mu\text{l}$ 的 Delfia 溶液中。用分光光度计 (Bio-Tek, synergy2, VT, USA; 激发波长为 340nm, 发射波长为 615nm, 时间延迟为 $400 \mu\text{s}$, 捕获时间为 $1000 \mu\text{s}$) 测量两块平板的时间分辨荧光 (游离或结合的 Eu^{3+} 抗体)。通过 Scatchard 分析确定解离常数 K_d , 其中线性呈现的结合比结合 / 游离的斜率代表了 $1/K_d$ 。对每种抗体重复两次确定 K_d , 每种荧光测量实施重复 3 次。根据上述结合测定,图 4A 和 4B 显示了随着抗体 VH16-R94K/VL43 ($K_d = 47\text{nM}$) 成为抗体 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A ($K_d = 10.9\text{nM}$) 的不同突变阶段的明显的 K_d 改善。后一种抗体相比亲本嵌合 FMC63 (11.8nM) 具有改善的 K_d 。

[0292] 铕标记的 FMC63 嵌合体和未标记的抗 CD19 人源化抗体之间的结合竞争或 K_i 确定

[0293] 另一种评估每种人源化抗体的结合亲和力的方法是测量相比亲本嵌合 FMC63 抗体与 Raji 细胞的结合竞争。为了抑制铕标记的嵌合 FMC63 (Eu^{3+} -FMC63) 与 Raji 细胞上表达的 CD19 抗原的结合,与增加浓度的未标记抗体一起添加恒量的 Eu^{3+} -FMC63。出于该目的,将 100 μl 体积的 Raji 细胞种植到 U 形底的 96 孔板中,所述细胞在补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)、2mM UltraGlutamine 1 (Lonza, Verviers, Belgium) 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 的 RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 中,制备的浓度为 1×10^6 细胞 / ml。将系列稀释的竞争抗体在 PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3 中制备到分离的 96 孔板中,之后与恒量的 Eu^{3+} -FMC63 混合。在采集 100 μl 前,将抗体稀释液冷却至 4°C,并添加到 Raji 细胞中。未标记的人源化抗体的最终稀释度范围是从 100nM 至 4.2pM,而 Eu^{3+} -FMC63 的浓度维持在 0.2nM。细胞在冰上用抗体孵育 15 分钟。在达到平衡后,在 1300RPM 离心细胞 2min,抛弃上清液。用 200 μl 冷的结合缓冲液 PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3 洗涤细胞沉淀 2 次,重悬在 100 μl 的 Delfia 溶液中。如上所述,用时间分辨荧光测量结合 Eu^{3+} -FMC63 的细胞。确定每个孔的 Eu^{3+} -FMC63 的量 (fmole),并相对于未标记抗体的总量绘图。用 GraphPad Prism 5 软件 (CA, USA) 进一步分析 Eu^{3+} -FMC63 的抑制结合曲线,使用单位点竞争模型,总配体固定浓度为 0.2nM;抑制结合常数在纳摩尔范围内。如表 20 所示和根据上文所示实验,不包括突变的框架 VH16VL43 展示出与 Raji 细胞极低的亲和力 (72.8nM),而人源化变体 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 表现出非常高的亲和力,等于 FMC63 嵌合体 (1.9nM 对比 1.4nM)。含标准偏差的结果被确定至少 3 次。

[0294] 表 20 :人源化抗 CD19 抗体的 K_i 确定。

[0295]

抗体	K_i (nM)
FMC63 嵌合体	1.4 ± 0.32
同种型对照 IgG1	No Competition
VH16/VL43	72.8
VH16-R94K/VL43	7.6
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	3.9 ± 1.02
VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	2.1 ± 0.5
VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	1.9
VH16-Y32F-R94K-Y97F/VL43-V3Q-T7S-N92A	49.9

[0296] 实施例 4 :评估抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 活性

[0297] 使用 CytoTox 96 非放射活性的细胞毒性测定试剂盒 (Promega, Madison, USA),通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测定测量人源化抗 CD19 抗体的 ADCC 活性。通过标

准的 Ficol1-paque 分离,从柠檬酸化的全血中纯化人外周血单核细胞 (PBMC),重悬在补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)、2mM UltraGlutamine1 (Lonza, Verviers, Belgium)、1% 青霉素 / 链霉素 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 和 100U/ml 人 IL-2 (Sigma, Missouri, USA) 的完全培养基 (RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)) 中, 37°C 下孵育过夜。第二天,通过离心收集 PBMC,洗涤两次,重悬在培养基中,密度为 8×10^6 细胞 /ml。使用实施例 2 中描述的 CD19⁺ 细胞系 Raji 作为靶细胞。洗涤 Raji 细胞两次,重悬在完全培养基中,密度为 0.2×10^6 细胞 /ml。将稀释为 1.5 μ g/ml 的 50 微升抗体 (终浓度为 0.5 μ g/ml) 与 50 μ l 靶细胞混合,添加至 U 形底的 96 孔板中的等体积 PBMC 中。在整个实验中使用 1 : 40 的靶比效应子比例。在 37°C 孵育 4 小时后,离心细胞,收集 50 μ l 无细胞上清液样品,转移到平底的 96 孔板中,并测定。如下计算裂解的百分比:(样品释放 - 靶自发释放 - 效应子自发释放)/(最大释放 - 靶自发释放) * 100;其中靶自发释放是仅含有靶细胞的孔中的荧光,效应子自发释放是仅有效应子细胞的孔中的荧光,而最大释放是含有已用裂解缓冲液处理的靶细胞的孔中的荧光。从样品裂解的百分比中减去在缺少抗体(靶 + 效应子细胞)的条件下获得的裂解的背景百分比。

[0298] 图 5A 和图 5B 显示了由于 IgG1 对照造成的极低的特异性 Raji 裂解。然而,对于 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A 抗体或 VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 抗体或 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 或嵌合 FMC63 而言,人源化抗体诱导的裂解增加至少 3 倍(图 5A 显示 3 种不同的供体的平均值 \pm 标准偏差,图 5B 显示 1 种供体重复实施 3 次的结果 \pm 标准偏差)。该数据证实,选定的人源化抗 CD19 抗体导致的表达 CD19⁺ 细胞的细胞性细胞毒性与亲本嵌合 FMC63 的相似。

[0299] 实施例 5 :抗 CD19 抗体的凋亡诱导

[0300] 为了测量抗体诱导的细胞死亡,在补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)、2mM UltraGlutamine 1 (Lonza, Verviers, Belgium) 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 的 RPMI-1640 培养基 ((Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 中制备 1×10^6 细胞 /ml 的如实施例 2 所述的 Raji 细胞,在 96 孔板中种植 100 μ l / 孔,在 24 孔板中种植 1ml / 孔。37°C 和 5% CO₂ 下孵育细胞 15min 至 24h,抗体浓度为 0.0016 至 1 μ g/ml (0.01 μ M 至 6.6 μ M)。孵育后,1300RPM 离心 U 形底平板中的细胞 3min,用 200 μ l 的 PBS 洗涤。每个孔中加入 100 μ l 的 1x 结合缓冲液 (BD Pharmingen, Allschwil, Switzerland),再加入 2.5 μ l 的膜联蛋白 V-FITC 和 2.5 μ l 碘化丙锭 (PI ;BD Pharmingen, Allschwil, Switzerland)。在流式细胞仪分析前,室温下用膜联蛋白 V 和 PI 孵育细胞。用膜联蛋白 V 和 PI 双重染色表征死亡的细胞群体,而活细胞既不被膜联蛋白 V 也不被 PI 染色。

[0301] 图 6 显示了用 1 μ g/ml 抗体孵育 Raji 细胞 2.5h 的膜联蛋白 V 和 PI 染色。令人惊讶的是,VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 和 VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 人源化抗 CD19 抗体诱导强烈的膜联蛋白 V 染色和细胞死亡,同时亲本嵌合 FMC63 对凋亡没有影响。值得注意的是,在图 6 中观察到的嵌合 FMC63 处理后轻微增加的膜联蛋白 V 染色是不可重复且不显著的。令人惊讶的,在添加人源化抗 CD19 抗体后 15min,就可用膜联蛋白 V 染色细胞,两种染色(膜联蛋白 V 和 PI)都在用人源化抗 CD19

抗体孵育 4h 后达到平台期（未显示）。抗 CD19 抗体造成的凋亡机制不同于抗 FasL 诱导的 Raji 细胞的凋亡。实际上，FasL 不诱导膜联蛋白 V 对 Raji 细胞染色（未显示）。该结果证实人源化作用使抗 CD19 抗体产生了新的特征。相比亲本嵌合 FMC63，人源化抗 CD19 抗体除触发同型细胞附着的能力（未显示）之外产生的新的凋亡特征是预料不到的，对抗 CD20 抗体的研究具有极大的重要性。实际上，Beers 等人已显示，具有强的凋亡和同型附着特性的抗 CD20 抗体在动物中具有更好的 B 细胞耗尽能力（Beers S. A. 等人，2008, Blood 112, 第 4170-4177 页）。此外，在添加抗 CD19 抗体后 15min，就可用膜联蛋白 V 染色 Raji 细胞。染色在 4h 孵育后达到平台期。该快速的凋亡事件优于抗 CD20 抗体，后者的凋亡效应一般在 24h 后观察到（Chan H. T. C. 等人，Cancer Research, 63 :5480-5489）。

[0302] 实施例 6 :在体外抑制恶性 B 细胞增殖

[0303] 增殖——alamarBlue

[0304] 为了测量抗体对细胞增殖的抑制，以 2×10^5 细胞 / 孔的密度种植细胞（Raji 或 SU-DHL-6，如实施例 2 所述），每孔 $100 \mu\text{l}$ 。用预先消毒的 $100 \mu\text{l}$ 抗体孵育细胞，并在补充了 10% 胎牛血清（FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland）、2mM UltraGlutamine 1（Lonza, Verviers, Belgium）和 1% 青霉素 / 链霉素（Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland）的 RPMI-1640 培养基（Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland）中稀释至终浓度为 0.0016 至 $1 \mu\text{g/ml}$ （ $0.01 \mu\text{M}$ 至 $6.6 \mu\text{M}$ ）。在 37°C 和 5% CO_2 下孵育平板 72 小时。然后将 $20 \mu\text{l}$ 的 alamarBlue（AbD Serotec, Düsseldorf, Germany）加入到细胞中 4 至 8 小时。生长的细胞导致化学降低 alamarBlue 荧光，在 540nm 的激发光和 620nm 的发射光对其进行监控。根据重复 3 次实施的实验，计算在处理 and 未处理细胞（仅用载体）之间的百分比差异。图 7A 显示了用抗体孵育 72h 后的 SU-DHL-6 的增殖水平。使用不相关的 IgG1 和强烈结合 SU-DHL-6 的抗 HLA-DR 抗体分别作为阴性和阳性对照。人源化抗体 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A、VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 和 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A（未显示）即使在低至 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 的浓度下对细胞增殖也具有强烈的抑制作用。因此，除了早期诱导凋亡外，抗 CD19 抗体在 72h 内阻断 B 细胞增殖。

[0305] 克隆发生

[0306] 克隆发生测定是另一种评估人源化抗 CD19 抗体造成肿瘤细胞死亡的方法。方法通常被用于评估抗体的抗增殖作用（Chan HTC, Cancer Research 2003）。我们使用集落形成性细胞测定和完全的 MethoCult 培养基（StemCell Technologies, Grenoble, France）来实施克隆发生测定。以 1×10^6 细胞 / ml 制备 Raji 细胞（如实施例 2 所述），以 $100 \mu\text{L}$ / 孔种植在 96 孔板中。然后，用 $100 \mu\text{L}$ 预先消毒，并在补充了 10% 胎牛血清（FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland）、2mM UltraGlutamine 1（Lonza, Verviers, Belgium）和 1% 青霉素 / 链霉素（Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland）的 RPMI-1640 培养基（Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland）中稀释的抗体（抗体浓度为 $0.2 \mu\text{g/ml}$ ）孵育细胞 90 分钟。然后，在 Iscove's 培养基中稀释 Raji 细胞和抗体，达到 $100 \mu\text{l}$ 中 500 个细胞的计数，最终与 1.1ml 的 MethoCult 培养基混合。使用结核菌素注射器，将 0.8ml 该制品分散在 35mm x 10mm 皿中。细胞在 37°C （5% CO_2 ）孵育 9 天，用显微镜（50x 放大）计数集落。结果显示在图 7B 中，与之前在实施例 5 中观察到人源化

抗体具有令人惊讶的凋亡特性（膜联蛋白-V 加 PI 染色）相关，在此相似的，人源化抗体表现出令人惊讶的良好的抗增殖特性，同时亲本嵌合 FMC63 对克隆发生只有非常低的影响或没有影响。人源化抗 CD19 抗体通过在孵育的前 90min 内诱导凋亡和杀伤作用，或者通过抑制细胞分裂，或者上述二者，强烈的减少了 Raji 克隆的数量。该实验对一些实验是代表性的，重复两次实施。结果验证了人源化抗 CD19 抗体对 B 细胞杀伤和抑制增殖的效应。

[0307] 实施例 7 :抗 CD19 单克隆抗体的内化作用

[0308] 使用 Hum-Zap 测定的内化作用

[0309] 为了评估抗体内化作用，使用与毒素肥皂草毒蛋白缀合的次级抗人抗体 (Hum-Zap, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA)。当核糖体失活蛋白——肥皂草毒蛋白内化时，诱导细胞死亡，之后可以使用 alamarBlue 测定监控。如实施例 2 所述以 1×10^5 细胞 /ml 种植 Raji 细胞，每孔 $100 \mu\text{l}$ ，在补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)、2mM UltraGlutamine 1 (Lonza, Verviers, Belgium) 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 的 RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 中。在 RPMI-1640 完全的细胞培养基中以 $100\text{ng}/10 \mu\text{l}$ 在预先制备的 Hum-Zap 中稀释抗体 (上文)。在 Raji 细胞上添加 $10 \mu\text{l}$ 抗体和 Hum-Zap 的混合物。抗体的最终浓度范围从 0.5 至 $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。然后，在使用 alamarBlue 测量细胞毒性前，用抗体孵育细胞 48h。如下计算细胞增殖的百分比：抗体处理的细胞的荧光（发射 590nm）/ 对照细胞（仅用 Hum-Zap）的荧光（发射光 590nm） $\times 100$ 。也实施含抗体和不含 Hum-Zap 的对照，在 48h 后未表现出对细胞增殖任何显著的效应。我们观察到人源化抗 CD19 抗体的内化作用（图 8）。之前的研究已描述过 CD19 在与抗体相互作用之后的内化作用，但在 Raji 细胞中，6h 后仍不明显，24h 后仍极低，在外周血的新鲜 B 细胞中也是如此 (Ingle G. S. 等人, BJH, 2007, 140, 第 46-58 页)。使用 Hum-Zap, 人源化抗 CD19VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 抗体的内化与亲本嵌合 FMC63 非常相似。然而，抗体 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A 展现出低得多的内化作用，在 $10\text{ng}/\text{ml}$ 没有内化。只有当设计治疗性抗体作为与细胞毒性净荷 (payload) 或毒素的缀合物使用时，高水平的内化作用才是理想的。

[0310] 实施例 8 :通过差示扫描量热法的抗 CD19 单克隆抗体的热稳定性

[0311] 如表 8、12-16 和 19 所示，使用量热法测量来比较人源化抗 CD19 单克隆抗体和嵌合 FMC63 的热稳定性。单克隆抗体解链曲线图形是其同种型的特征 (Garber 和 Demarest (2007), BBRC 355 :751-7)，然而，即使在全长 IgG 背景中，也可以方便的鉴别 FAB 片段的中点解链温度。FAB 部分的此类中点解链温度用于监控人源化候选物的单克隆稳定性。

[0312] 在 VP-DSC 差示扫描微量热计 (MicroCal, Northampton, UK) 上进行量热法测量。细胞体积是 0.128ml ，加热速率是 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ，超压保持在 64p. s. i。使用的所有蛋白质片段浓度都是在 PBS (pH 7.4) 中 $1-0.5\text{mg}/\text{ml}$ 。通过比较重复两次的、含有省略了蛋白质的相同缓冲液的样品，来估计每种蛋白质的摩尔热容。使用标准程序分析部分摩尔热容和解链曲线。在使用软件 Origin v7.0 中的 Non-Two State 模型进一步分析前，将热谱图进行基线校正和浓度归一化。

[0313] 实施例 9 :B 细胞耗尽研究

[0314] 在人的全血中 B 细胞耗尽

[0315] 为了评估人源化抗 CD19 抗体耗尽人全血中的 B 细胞的能力, 实施 B 细胞耗尽测定。通过静脉穿刺获得外周血, 在补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)、2mM UltraGlutamine1 (Lonza, Verviers, Belgium) 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 的 RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 中稀释 2 倍。将稀释的全血种植在 24 孔板 (1-2mL/ 孔) 中, 加入 10 μ g/ml 抗体或 PBS (未处理的), 并在 37°C 和 5% CO₂ 孵育平板 24h。用 RBS 裂解缓冲液 (eBiosciences, THP Medical Products, Vienna, Austria) 室温下裂解血液 5min (进行两次), 并以 1100RPM 离心 3min。用 2ml 结合缓冲液 (PBS, 2.5% FCS, 100mg/l MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, 0.05% NaN₃ 和 10% Versene (v/v)) 洗涤细胞沉淀。然后, 将细胞重悬在 0.5ml 结合缓冲液中, 用抗 CD19-PE-Cy5 或抗 CD20-PE、或抗 CD22-FITC 抗体染色。在冰上孵育 20 分钟后, 用结合缓冲液洗涤细胞一次, 通过流式细胞仪分析。确定 B 细胞的百分比, 并如下计算百分比改变: (未处理的 (PBS) 细胞中的 B 细胞% - 抗体处理的细胞中的 B 细胞%) / (未处理的 (PBS) 细胞中的 B 细胞%) x 100。

[0316] 如表 21 所示, 将 10 μ g/ml 抗体用于四个血液供体上, 在用人源化抗 CD19 抗体处理后观察全血中的 B 细胞耗尽。在对照 IgG1 处理后没有观察到 B 细胞数量的改变。通常, 当用对照 IgG1 孵育时, CD19⁺ 或 CD20⁺ 或 CD22⁺ B 细胞代表了 9 至 10% 的白细胞群体。抗体 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 对 B 细胞耗尽具有最高的影响 (均值 = 15.25%), 而亲本嵌合 FMC63 是最无效的 (均值 = 7.25%)。

[0317] 表 21 : 全血的 B 细胞耗尽

[0318]

抗体 (10ug/ml)	% 改变				均值
	供体 1	供体 2	供体 3	供体 4	
无 Ab (PBS)	0	0	0	0	0
对照 IgG1	0	0	0	0	0
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	5	4	22	19	12.5± 8.0
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	15	20	10	16	15.25± 3.5
嵌合 FMC63	0	10	12	7	7.25± 4.54

[0319] 实施例 10 : 具有增强的补体介导的效应子功能的 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 变体

[0320] 出于增强补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的目的, 设计多个变体。以相同的方式, Fc 与 Fc γ 受体相互作用结合介导 ADCC, Fc 与补体组分 C1q 相互作用介导 CDC。虽然目前没有可获得的关于 Fc/C1q 复合物的结构, 但一些研究已将人 IgG 上与 C1q 的结合位点定位于集中在残基 D270、K322、P329 和 P331 之上的区域 (Idusogie 等人, The Journal of Immunology,

2000, 164 :4178-4184)。在 CH2 结构域的 D269-K334 区中设计氨基酸修饰,探索可介导增强的 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 的 CDC 的变体。

[0321] 研究显示,在位置 E269、S298 和 S324 上的残基取代导致变体具有至少约 1.6 倍 (图 9) 至最大 5.5 倍 (图 10) 的 CDC 增加。

[0322] 为了产生这些变体 cDNA 编码序列,通过标准诱变,将编码 VH16R94K 重链 (SEQ ID NO :64) cDNA 的 cDNA 转化为重链 VH16R94K/324(NNK)、VH16R94K/S298A (SEQ ID NO :114)、VH16R94K/E269D/S298A (SEQ ID NO :115)、VH16R94K/S298A/S324N (SEQ ID NO :116)、VH16R94K/E269D/S298A/S324N (SEQ ID NO :117)。324 位的 NNK 描述了用 NNK 密码子取代野生型丝氨酸编码密码子,所述密码子提供了所有 20 种氨基酸的取代 (硬性随机化)。

[0323] 将这些变体编码 DNA 序列连接到基于修饰的 pREP4 (Invitrogen, CA, USA) 载体的载体中,所述载体携带 CMV 启动子和牛生长激素多聚腺苷酸化信号。在该表达载体中,分泌受鼠 VJ2C 前导肽的驱动。

[0324] 为了瞬时表达,使用聚乙烯亚胺 (PEI),将等量的各种重链和轻链载体共转染到适应悬浮的 HEK-EBNA 细胞 (ATCC-CRL-10852) 中。通常,用含有 50 μ g 编码变体重链的表达载体和 50 μ g 编码 VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 轻链的表达载体的 DNA-PEI 混合物,转染 100ml 密度为 0.8-1.2 百万细胞 /ml 的细胞悬浮液。当编码各种改造的链基因的重组表达载体被导入宿主细胞中时,进一步培养细胞为期 4 至 5 天来生产构建体,以允许分泌到培养基 (EX-CELL 293, HEK293- 无血清培养基, Sigma, Buchs, Switzerland) 中,所述培养基补充了 0.1% pluronic acid、4mM 谷氨酰胺和 0.25 μ g/ml 遗传霉素。然后,使用重组的 Streamline rProtein A 基质 (GE, Switzerland),从无细胞上清液中纯化构建体,并用于进一步分析。

[0325] 表 22 中列举了这些变体的表达水平。

[0326] 表 22 :VH16R94K/VL43V3Q-T7S-P44I-N92A 重链变体的 IgG 瞬时表达水平。

[0327]

Antibody	Expression (mg/L)
VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	38
VH16 R94K/S324A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	48
VH16 R94K/S324V-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	1.5
VH16 R94K/S324L-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	20
VH16 R94K/S324I-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	24
VH16 R94K/S324P-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	15
VH16 R94K/S324T-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	0.5
VH16 R94K/S324C-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	10
VH16 R94K/S324M-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	24
VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	54
VH16 R94K/S324Q-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	44
VH16 R94K/S324F-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	48
VH16 R94K/S324Y-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	61
VH16 R94K/S324W-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	62
VH16 R94K/S324R-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	35
VH16 R94K/S324D-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	42
VH16 R94K/S324G-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	27
VH16 R94K/S324K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	7
VH16 R94K/S324E-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	26
VH16 R94K/S324H-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	-
VH16 R94K/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	54
VH16 R94K/E269D/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	12
VH16 R94K/S298AS324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	30
VH16 R94K/E269D/S298AS324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	11

[0328] 补体介导的对 Raji 细胞的毒性

[0329] 使用基于细胞的测定来测量变体介导 CDC 的能力。

[0330] 通过幼兔补体 (Harlan Laboratories, C-0099F, AN VENRAY, The Netherlands), 使用乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放, 监控变体调理 Raji 细胞的裂解作用, 来测量裂解。通过离心和重悬, 用完全培养基 (补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 和 1% UltraGlutamine 1 (Lonza, Verviers, Belgium) 的 RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)) 洗涤靶细胞 2 次。添加的变体抗体的标示最终浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 。用完全培养基稀释幼兔血清至 7.5%, 加入到抗体调理的靶细胞中。37°C 下孵育平板 3 小时。使用 Cyto Tox 96 非放射活性细胞毒性测定试剂盒 (Promega, Madison, USA) 测量细胞的细胞毒性。

[0331] 该测定的代表性数据显示在图 9 和图 10 中。

[0332] 图 9 和图 10 显示了由于 IgG1 对照抗体 (**Herceptin®**, Roche Pharma A. G., Reinach, Switzerland) 造成的极低的特异性裂解; 然而, 对于 VH16R94K/S324N (SEQ ID NO: 118)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65) 抗体, 补体诱导的裂解增加至少 1.6 倍

(图 9) 至最大 5.5 倍 (图 10), 这取决于由于 Raji 细胞活力的改变造成的测定的变化性; VH16R94K/S298A/S324N(SEQ ID NO :116)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A(SEQ ID NO :65) 抗体和 VH16R94K/E269D/S298A/S324N(SEQ ID NO :117)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A(SEQ ID NO :65) 抗体也表现出比亲本抗体改善的 CDC(至少 4.4 倍)。图 9 和图 10 显示了重复 3 次的结果 ± 标准偏差。

[0333] 实施例 11: 具有增强的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 的 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 变体

[0334] 评估了实施例 10 所述研究中探讨的抗 CD19 抗体变体引发 ADCC 的能力, 所述变体具有位置 E269、S298 的残基取代。

[0335] 使用 CytoTox 96 非放射活性的细胞毒性测定试剂盒 (Promega, Madison, USA), 通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测定测量抗体的 ADCC 活性。通过标准的 Ficol1-paque 分离, 从柠檬酸化的全血中纯化人外周血单核细胞 (PBMC), 重悬在完全培养基 (补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)、2mM UltraGlutamine1 (Lonza, Verviers, Belgium)、1% 青霉素 / 链霉素 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 和 100U/ml 人 IL-2 (Sigma, Missouri, USA) 的 RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)) 中, 37°C 下孵育过夜。第二天, 通过离心收集 PBMC, 洗涤两次, 重悬在培养基中, 密度为 8×10^6 细胞 / ml。使用实施例 2 中描述的 CD19⁺ 细胞系 Raji 作为靶细胞。洗涤 Raji 细胞两次, 重悬在完全培养基中, 密度为 0.2×10^6 细胞 / ml。将稀释为 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 的 50 微升抗体 (终浓度为 $0.5 \mu\text{g/ml}$) 与 50 μl 靶细胞混合, 添加到 U 形底的 96 孔板中的等体积 PBMC 中。在整个实验中使用 1 : 40 的靶比效应子比例。在 37°C 孵育 4 小时后, 离心细胞, 收集 50 μl 无细胞上清液样品, 转移到平底的 96 孔板中, 并测定。如下计算裂解的百分比: $(\text{样品释放} - \text{靶自发释放} - \text{效应子自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{靶自发释放}) * 100$; 其中靶自发释放是仅含有靶细胞的孔中的荧光, 效应子自发释放是仅含有效应子细胞的孔中的荧光, 而最大释放是含有已用裂解缓冲液处理的靶细胞的孔中的荧光。从样品裂解的百分比中减去在缺少抗体 (靶 + 效应子细胞) 的条件下获得的裂解的背景百分比。

[0336] 图 11 显示 IgG 对照抗体 (**Herceptin®**, Roche Pharma A.G., Reinach, Switzerland) 不导致任何特异性 Raji 裂解, 亲本抗体导致一些细胞毒性; 所示数据是使用分离自一个供体的 PBMC 重复三次的孔的平均细胞毒性百分比 ± SD。然而, VH16-R94K/S298A(SEQ ID NO :114)-VL43-V3Q/T7S/P44I/N92A(SEQ ID NO :65) 抗体的抗体诱导的裂解增加至少 5 倍, 而 VH16-R94K/E269D/S298A(SEQ ID NO :115)-VL43-V3Q/T7S/P44I/N92A(SEQ ID NO :65) 抗体为至少 6.8 倍。该数据证实, 选定的抗 CD19 抗体变体对表达 CD19⁺ 的细胞具有增强的细胞性细胞毒性。

[0337] 实施例 12: 基于源自人 Ig- γ 3 和人 Ig- γ 1/Ig- γ 3 铰链 -Fc 结构域改组的氨基酸取代, 而具有增强的补体介导的效应子功能的 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 变体

[0338] 人 IgG3 抗体一般具有比人 IgG1 抗体增强的 CDC, 这部分是由于 IgG3Fc 具有比 IgG1Fc 更高的 C1q 结合亲和力 (Schumaker VN 等人, Biochemistry, 1976, 15 :5175-81)。

[0339] 基于在人 IgG3 和人 IgG1Fc 部分之间的序列差异, 进行 VH16R94K 的 Fc 区的氨基酸修饰。在互补的方法中, 实施人 IgG1 铰链区和恒定结构域与人 IgG3 铰链区和恒定结构

域的改组,产生具有增强的 CDC 的嵌合的抗 CD19 抗体同种型。

[0340] 研究显示,位置 K274 和 N276 的残基的取代,以及由各来自 IgG1 的 CH1 和铰链与来自 IgG3 的 Fc 组成的嵌合变体(由 1133suffix 设计),导致 CDC 分别增加 1.7 和 2.2 倍。

[0341] 为了产生在位置 K274 和 N276 具有残基取代的变体 cDNA 编码序列,通过标准诱变技术,将编码 VH16R94K 重链 (SEQ ID NO :64) cDNA 的 cDNA 转化为重链 VH16R94K/K274Q (SEQ ID NO :119)、VH16R94K/N276K (SEQ ID NO :120)、VH16R94K/K334R (SEQ ID NO :121)、VH16R94K/K274Q/N276K (SEQ ID NO :122) 和 VH16R94K/K274Q/N276K/K334R (SEQ ID NO :123)。

[0342] 此外,通过用人 IgG3 重链基因 (NCBI GenBank 登录号 X03604.1, 残基 161 至 377) 的相应部分取代 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A IgG1 表达载体中的部分重链基因(编码 Kabat 残基 231 至其羧基端),产生了人抗 CD19VH16R94K(1133) (SEQ ID NO :124)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 嵌合同种型。

[0343] 将这些变体编码 DNA 序列连接到基于修饰的 pREP4 (Invitrogen, CA, USA) 载体的载体中,所述载体携带 CMV 启动子和牛生长激素多聚腺苷酸化信号。在该表达载体中,分泌受鼠 VJ2C 前导肽的驱动。

[0344] 为了瞬时表达这些变体,使用聚乙烯亚胺 (PEI),将等量的各种重链和轻链载体共转染到适应悬浮的 HEK-EBNA 细胞 (ATCC-CRL-10852) 中。通常,用含有 50 μ g 编码变体重链的表达载体和 50 μ g 编码 VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 轻链的表达载体的 DNA-PEI 混合物,转染 100ml 密度为 0.8-1.2 百万细胞/ml 的细胞悬浮液。当编码各种改造的链基因的重组表达载体被导入宿主细胞中时,进一步培养细胞为期 4 至 5 天来生产构建体,以允许分泌到培养基 (EX-CELL 293, HEK293- 无血清培养基, Sigma, Buchs, Switzerland) 中,所述培养基补充了 0.1% pluronic acid、4mM 谷氨酰胺和 0.25 μ g/ml 遗传霉素。然后,使用重组的 Streamline rProtein A 基质 (GE, Switzerland),从无细胞上清液中纯化构建体,并用于进一步分析。

[0345] 表 23 中列举了这些变体的表达水平。

[0346] 表 23 :VH16R94K/VL43V3Q-T7S-P44I-N92A 重链变体的 IgG 瞬时表达水平。

[0347]

抗体	表达 (mg/L)
VH16 R94K/K274Q/N276K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	12
VH16 R94K (1133)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	21

[0348] 补体介导的对 Raji 细胞的毒性

[0349] 根据实施例 10,使用基于细胞的测定来测量变体介导 CDC 的能力。通过幼兔补体 (Harlan Laboratories, C-0099F, AN VENRAY, The Netherlands),使用乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放,监控变体调理的 Raji 细胞的裂解作用,来测量裂解。通过离心和重悬,用完全培养基(补充了 10%胎牛血清 (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 和 1% UltraGlutamine 1 (Lonza, Verviers, Belgium) 的 RPMI-1640 培养基 (Chemie Brunschwig

AG, PAA, Basel, Switzerland)) 洗涤靶细胞 2 次。添加的变体抗体的标示最终浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。用完全培养基稀释幼兔血清至 5%，加入到抗体调理的靶细胞中。37°C 下孵育平板 3 小时。

[0350] 使用 Cyto Tox 96 非放射活性细胞毒性测定试剂盒 (Promega, Madison, USA) 测量细胞的细胞毒性。该测定的代表性数据显示在图 12 中。

[0351] 图 12 显示了由于 IgG1 对照造成的极低的特异性裂解。相比亲本抗体时, 对于 VH16R94K/K274Q/N276K (SEQ ID NO :122)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 抗体, 补体诱导的裂解增加至少 1.7 倍, 对于 VH16R94K/K274Q/N276K/K334R (SEQ ID NO :123)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 抗体, 增加至少 2 倍, 对于 VH16R94K (1133) (SEQ ID NO :124)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 抗体, 增加至少 2.2 倍。图 12 显示了实施重复 3 次的结果 \pm 标准偏差。

[0352] 实施例 13 : 建立表达抗 CD19 抗体的细胞系

[0353] 开发了高产的哺乳动物蛋白质表达系统。所述系统是基于充分公开的 CHO 细胞系 (CHO-S, Invitrogen, Basel, Switzerland), 其被改造以适应在化学定义的血清培养基中悬浮生长, 和鉴别高产细胞系的克隆群体的高度有效的转染方法和筛选对策。该哺乳动物蛋白质表达系统用于稳定表达抗 CD19 抗体的人源化变体。

[0354] 将用于实施例 1 的携带 VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 轻链 (SEQ ID NO :65) 的 cDNA 序列的质粒, 和携带 VH16R94K 重链 (SEQ ID NO :64) 的 cDNA 序列的质粒 pAE18_VH16_R94K 都用 XbaI 和 HindIII 消化, 以释放轻链和重链插入物。通过凝胶电泳分离这些插入物, 凝胶提取、纯化和进一步克隆到基于 Promega 的 pGL3 (Madison, WI, USA) 的表达载体的多克隆位点中, 所述载体已预先用相同的限制性酶消化, 并使用相同的凝胶电泳和纯化方法制备。这产生 2 种表达质粒 : pGL41[18_HC] 质粒和 pGL41[18_LC] 质粒, 分别携带 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 抗 CD19 抗体的重链和轻链。

[0355] 从 Clontech (Mountain View, CA, USA) 购买表达遗传霉素抗性基因 neo 的载体 pSV2neo, 和通过克隆 SV40 启动子和 pBABE-Puro (Addgene, Cambridge, MA, USA) 的嘌呤霉素抗性基因 (pac) 到 Promega 的 pGL3 载体中, 获得嘌呤霉素抗性载体 pSV-Puro。使用氨苄青霉素抗性基因 (ampR) 中的单个限制性位点, 将这 4 种质粒线性化, 并通过乙醇沉淀从剩余的盐纯化。相似的, 使用与上述相同的限制性酶, 切割用于其他人源化变体 (VH16R94K/Y100BF (SEQ ID NO :66)-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 和 VH16R94K/Y100RF (SEQ ID NO :66)-VL43V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A (SEQ ID NO :67)) 的表达载体, 并克隆到 pGL41 骨架中。

[0356] 为了稳定的整合到宿主细胞系 CHO-S (Invitrogen) 中, 将 10ml 细胞以 1×10^6 细胞 /ml 的密度种植在 50ml 生物反应器过滤管 (TPP, Trasadingen, Switzerland) 中, 培养过夜。在转染前, 用转染培养基 (Opti-MEM, Invitrogen) 替换化学定义的细胞培养基 (PowerCHO2, Lonza, Basel, Switzerland)。根据生产商的说明, 使用 polykationic 转染剂 JetPEI (Polyplus-transfections, Illkirch, France), 用 $12.5 \mu\text{g}$ 线性化载体混合物转染细胞, 所述混合物含有重链和轻链表达质粒 pSV-Puro 和 pSV2neo 的混合物。在转染 4-5 小时后, 用 1 体积的生长培养基稀释细胞。在含有 $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素和 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 遗传霉素的生长培养基中, 按 1 : 10、1 : 20 或 1 : 30 的比例, 稀释下列天数的细胞, 并分布在 96

孔板中。在选择 14 天后,使用抗体特异性 ELISA 测定药物抗性集落,并扩增阳性单个克隆进行抗体生产分析。为了获得克隆群体,在细胞培养基 (PowerCHO2, Lonza) 中,将表现最好的克隆按浓度 1、10 和 100 细胞 /ml 稀释。最后,生产最好的克隆产生的滴度范围是:在 12 天的振荡分批测定中,VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 抗体 400-600mg/L,VH16R94K/Y100BF-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 和 VH16R94K/Y100aF-VL43V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A 抗体 200-300mg/L,使用补充了谷氨酰胺的 PowerCHO2 细胞培养基。

[0357] 实施例 14:生产去岩藻糖基化的抗 CD19 抗体的变体

[0358] 在哺乳动物中,岩藻糖残基通过 α -1,6- 键连接在几乎所有复杂类型的 Asn 连接寡糖的最内部的 GlcNAc 残基上。制备表达大鼠 β -1,4- 甘露糖 - 糖蛋白 4- β -N- 乙酰葡萄糖胺转移酶 (GNTIII) 的稳定细胞系。该酶在糖蛋白 (例如抗体) 的 N 连接寡糖中导入了二分支的 N- 乙酰葡萄糖胺。此类修饰将抗体的 Fc 寡糖转变为酶 Fut8 不可接近的底物,所述酶将岩藻糖残基转移至聚糖树的还原型 N- 乙酰葡萄糖胺上 (Longmore 和 Schachter, 1982, Carbohydr Res 365-92),从而抑制岩藻糖基化。大鼠 gntIII 购自 Imagenes (Berlin, Germany), 并使用特异性引物扩增。然后,使用酶 BamHI 和 HindIII 消化扩增子,凝胶纯化和克隆到表达载体 pGLEX33 的 BamHI、HindIII 开放的多克隆位点中;pGLEX33 是基于 Invitrogen 的 pcDNA3.1 质粒 (Basel, Switzerland) 的哺乳动物表达载体,处于小鼠 CMV 启动子的控制下。所获得的载体被称为 pGNTIII。

[0359] 通过克隆 SV40 启动子和 pBABE-Puro (Addgene, Cambridge, MA, USA) 的嘌呤霉素抗性基因 (pac) 到 Promega (Madison, WI, USA) 的 pGL3 中,获得嘌呤霉素抗性载体 pSV-Puro。使用氨苄青霉素抗性基因 (ampR) 中的单个限制性位点,将这 2 种质粒线性化,并通过乙醇沉淀从剩余的盐纯化。

[0360] 为了稳定的整合到宿主细胞系 CHO-S (Invitrogen) 中,将 10ml 细胞以 1×10^6 细胞 /ml 的密度种植在 50ml 生物反应器过滤管 (TPP, Trasadingen, Switzerland) 中,培养过夜。在转染前,用转染培养基 (Opti-MEM, Invitrogen) 替换化学定义的细胞培养基 (PowerCHO2, Lonza, Basel, Switzerland)。根据生产商的说明,使用 polykationic 转染剂 JetPEI (Polyplus-transfections, Illkirch, France), 用 12.5 μ g 线性化载体混合物转染细胞,所述混合物含有 pGNTIII 和 pSV-Puro 的混合物。在转染 4-5 小时后,用 1 体积的生长培养基稀释细胞。在含有 5.0 μ g/ml 嘌呤霉素的生长培养基中,按 1 : 10、1 : 20 或 1 : 30 的比例,稀释下列天数的细胞,并分布在 96 孔板中。在选择 14 天后,分离表达大鼠 GNTIII 基因的药物抗性集落。

[0361] 使用 Invitrogen 的 CHO-S 细胞系制备第二个稳定的细胞系。使用以前描述的 shRNA 序列 (Imai-Nishiya 等人, 2007, BMC Biotechnol., 7 :84), 用表达敲低酶 Fut8 (α -1, 6- 岩藻糖基转移酶) 和 GMD (GDP- 甘露糖 -4, 6- 脱水酶) 的小发夹 RNA (shRNA) 的载体转染细胞,所述 shRNA 处于人 U6 启动子和 tRNA^{Val} 启动子的控制下。构建体购自 GeneArt A. G. (Regensburg, Germany)。详细而言, tRNAT^{Val} 启动子控制 Fut8 特异性 shRNA 的表达,而 U6 启动子控制 GMD 特异性 shRNA 的表达。构建体的侧翼是 NheI 和 NruI 位点,而这些限制性位点用于将被消化且凝胶纯化的片段克隆到用相同的酶以前消化过的 pGLEX1 (pcDNA3.1 (Invitrogen) 的修饰版本) 载体骨架中。

[0362] 如果将细胞培养在缺少岩藻糖的条件下,组合敲低从头通路的这两种酶已表现出

对促进 IgG1 的 N 连接寡糖结构中的岩藻糖缺失具有协同效应 (Imai-Nishiya 等人, 2007, BMC Biotechnol. 7 :84)。因为 GMD 酶不是拯救通路的一部分, 因此在存在岩藻糖的条件下, 岩藻糖基化的降低将依赖于敲低 Fut8 酶。用双重敲低表达盒转染的细胞之前表现出丧失了 N 连接寡糖中 90-98% 的岩藻糖基化 (Imai-Nishiya 等人, 2007, BMC Biotechnol. , 7 : 84)。为了稳定的整合到宿主细胞系 CHO-S (Invitrogen) 中, 使用氨苄青霉素抗性基因中的单个限制性位点, 将 siRNA 载体线性化。用选择质粒共转染细胞, 并如上所述进行选择。

[0363] 用编码分别如实施例 1 和 11 所述 VH16R94K (SEQ ID NO :64) -VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 抗体和 VH16R94K/E269D/S298A (SEQ ID NO :115) -VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 抗体的质粒, 瞬时转染两种细胞系。

[0364] 为了瞬时转染, 将 200ml 细胞以 1×10^6 细胞 /ml 的密度种植在 1000ml 圆形 Schott 瓶中, 培养过夜。在转染前, 用 100ml 转染培养基 (Opti-MEM, Invitrogen) 替换化学定义的细胞培养基 (PowerCHO2, Lonza)。根据生产商的说明, 使用 polykationic 转染剂 JetPEI (Polyplus-transfections), 用 250 μ g 载体混合物转染细胞, 所述混合物含有 50% 重链和 50% 轻链 DNA 的混合物。在转染 4-5 小时后, 用 1 体积的生长培养基稀释细胞。在第 5 天收获培养基。在离心后, 过滤 (0.2 μ m) 上清液, 在 Akta 纯化系统 (GE healthcare) 上通过蛋白 A 亲和层析 (Hitrap, GE healthcare, Zurich, Switzerland) 纯化。如实施例 11 所述实施 ADCC 测定。

[0365] 以 shRNA 生产的抗体变体和上述 GNTIII 细胞系分别由 shRNA 或 GNTIII suffix 设计。图 13 显示, 去岩藻糖基化变体具有比其岩藻糖基化的亲本抗体增加至少 2 倍的 ADCC。

[0366] 实施例 15 : 在人源化 SCID 小鼠中, 抗 CD19 抗体对 B 细胞移植物移入的效应。

[0367] 该研究设计为评估抗 CD19 处理 huPBL SCID 小鼠的体内效应。在开始处理前, 将 30 只 5-6 周龄且称重为 16-20g、健康的雌性严重联合免疫缺陷病 (SCID, HARLAN) 小鼠基于体重随机化为 1 组 2 只动物, 另外 4 组 7 只动物。每组的平均体重是可比较的, 与其他组没有统计学差异 (方差分析)。然后, 在 D0 天使用 γ -源 (1.8Gy, 60Co, INRA BRETENIERE, Dijon, France), 将所有的小鼠进行全身辐射。在 D1 和 D8 天, 小鼠接受 20mg/kg 的 NK 细胞耗尽的 Ab (mCD122 抗原, 大鼠 IgG2b 同种型, TM-Beta 1, BioXCell, USA) 的单次 SC 注射。

[0368] 获得健康自愿者供体的 4 种新鲜收集的暗黄覆盖层样品, 在收集全血后的 48h 内, 根据 Ficoll-**Paque**[®] plus 程序 (Ref 07907, StemCell Technologies), 使用梯度离心纯化外周血单核细胞 (PBMC)。在体内注射前, 通过 0.25% 台盼蓝排出评估 PBMC 的活力。在 D3, 用来自供体 #1、#2 和 #3 的 3×10^7 hPBMC (组 2 至 5, 2-3 只小鼠 / 供体) 或 PBS (组 1) IP 注射小鼠 (通过 IP 途径注射 PBS 中的 500 μ L)。在 D14, 组 2、3、4 和 5 的小鼠分别以 10mg/kg/inj 接受 **Herceptin**[®] (阴性对照, 21.0mg/ml, Batch N^o B1492)、**Mabthera**[®] (阳性对照, 10.0mg/ml, Batch N^o B2136)、抗 CD19 抗体变体 VH16R94K (SEQ ID NO : 64) -VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 或抗 CD19 抗体变体 VH16R94K/S324N (SEQ ID NO :118) -VL43V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO :65) 的单次 IV 注射。下表 24 概括了处理规程 :

[0369] 表 24 : 处理规程

[0370]

组	小鼠数	辐照	NK-细胞耗尽 AB (D1, D8)	HPBMC (D3)	处理 (D14, Q1Dx1)
1	2	有	有	无 (PBS)	无
2	7	有	有	3 个供体 2-3 小鼠/供体	Herceptin® (10 mg/kg, IV)
3	7	有	有	3 个供体 2-3 小鼠/供体	Mabthera® (10 mg/kg, IV)
4	7	有	有	3 个供体 2-3 小鼠/供体	VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (10 mg/kg, IV)
5	7	有	有	3 个供体 2-3 小鼠/供体	VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (10 mg/kg, IV)

[0371] 通过 4 色流式细胞仪分析检测脾脏中的人 B 淋巴细胞。对于每个样品, 使用 hCD45(+)、mCD45(-)、hCD20(+) 和 hCD19(+) 和 PKH26 参照微珠 (Ref P7458, Sigma) 的细胞表面表达定量人 B 淋巴细胞。使用下表 25 中描述的抗体。

[0372] 表 25 : 检测人 B 淋巴细胞的抗体

[0373]

抗原	克隆	同种型	荧光染料	Ref
hCD19	4G7	小鼠 IgG ₁ , κ	PerCP	BD ^a 345778
hCD45	HI30		APC	BD 555485
hCD20	L27		FITC	BD 345792
mCD45	30-F11	大鼠 IgG _{2b} , κ	APC-Cy7	BD 557659
mIgG ₁	MOPC-21	小鼠 IgG ₁	FITC	BD 555748
mIgG ₁	X40		PerCP	BD 345817
mIgG ₁	MOPC-21		APC	BD 555751
rIgG _{2b}	A95-1	大鼠 IgG _{2b} , κ	APC-Cy7	BD 552773

[0374] ^a BD : Becton Dickinson Biosciences, Le Pont de Claix, France

[0375] 对于 CD 标志物表达分析, 将 100000 个脾脏细胞在 200 μL 染色缓冲液 (PBS (Ref 17-516F, Lonza)、0.2% BSA (Ref A7030, Sigma)、0.02% NaN₃ (Ref S2002, Sigma)) 中室温下黑暗孵育 20 分钟, 其具有 hCD19PerCP、hCD20FITC、hCD45APC 和 mCD45APC-Cy7 抗体的混合溶液, 或 mIgG₁-FITC、rIgG_{2b}-APC-Cy7、mIgG₁-APC 和 mIgG₁-PerCP 抗体的混合溶液。在

每种情况下使用同种型对照抗体作为阴性对照。

[0376] 使用“固定和裂解”程序裂解红血细胞。简而言之,通过在 1mL 的 VersaLyse (Ref A09777, Beckman Coulter) 添加 25 μ L 的 IOTest 310X 固定溶液 (Ref A07800, Beckman Coulter), 来制备“固定和裂解”缓冲液,并向染色的细胞中添加 1ml 所述混合物。在振荡和室温下黑暗孵育 10min 后,离心细胞,并用 3mL 染色缓冲液洗涤 1 次,重悬在 0.5mL 参照微珠溶液 (PKH26, Ref P7458, Sigma, 在染色缓冲液中 1/2 稀释) 中。将样品保藏在冰上,直到 FACS 分析为止免受曝光。用 **CyFlow**[®] space 流式细胞仪 (Partec S. A. R. L.) 分析染色的细胞,使用 488nm 波长激光激发。对每个样品,在收集共计 10,000 个 hCD45(+) (如果可实现的话) 后停止获取。保存获取过程中的所有事件。

[0377] 用显示 FSC 比 SSC 参数 (正向和侧向散射探测器) 的点印迹 (为了使细胞尺寸和复杂性可视化) 和显示 hCD45(FITC) 荧光强度的点印迹表示 FACS 结果。

[0378] 通过使用下列公式实现对绝对细胞计数的计算:

[0379]

$$ACN = \frac{CN}{BN} \times \frac{\text{珠浓度}}{2} \times Vf \times \frac{1}{Vi}$$

[0380] 其中:

[0381] -ACN 是每 L 的绝对细胞数,

[0382] -CN 是细胞数,

[0383] -BN 是珠数。

[0384] -根据生产商提供的批次,稍后说明珠子浓度。

[0385] -Vf (以 mL 表示) 是用于重悬细胞沉淀的微珠溶液的体积。

[0386] -Vi (以 μ L 表示) 是用于 FACS 分析的初始血液体积。

[0387] 图 14 显示了 D18 时,移植 SCID 小鼠的脾脏中的总 B 细胞的单个 ACN。图 15 显示了 D18 时,移植 SCID 小鼠的脾脏中的总 B 细胞的单个百分比。

[0388] 除了 hPBMC& 抗 -CD 19 变体 V18 组的一只小鼠 (小鼠 N° 3817) 外,所有的小鼠都成功的移植了 hPBMC,导致在小鼠的血液中检测到循环的人 CD45+ 白细胞。在大部分移植 hPBMC 的小鼠中,人 CD45+ 白细胞的水平超过了 15% 的血细胞。此外,在 52% 的移植小鼠中,观察到高水平的人细胞重建 (在血细胞中达到 31-73% hCD45+ 白细胞)。在实验过程中,hCD45+ 白细胞的水平没有改变或是增加的。在移植后第 18 天,在脾脏中也检测到人 CD45+ 白细胞,脾脏细胞中的平均移植水平是约 45% hCD45+ 细胞。

[0389] 当在给药后第 4 天杀死小鼠时,分析脾脏中的人 B 细胞群体;换言之这是移植后的第 18 天。在阴性对照组的所有移植小鼠中,脾脏在 hCD45+ 白细胞中含有 5 至 11% B 细胞。脾脏中的人 B 细胞由 hCD19+ 或 hCD20+ 单阳性细胞以及 hCD19+hCD20+ 双阳性 B 细胞构成。在用 **Mabthera**[®]、抗 CD 19 抗体变体 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 或抗 CD 19 抗体变体 VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 处理的小鼠脾脏中,只检测到低水平 (< 3%) 的人 B 细胞,相比 **Herceptin**[®] 组,人 B 细胞群体的减少是统计学显著的。另一方面,在抗 CD 19 变体抗体 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 或抗 CD 19 抗体变体

VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 和 **Mabthera®** 处理之间, 对脾脏的 B 细胞耗尽没有观察到统计学差异。

[0390] 结果证实, 单次 IV 注射 10mg/kg 的抗 CD 19 抗体变体 VH16R94K-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 或抗 CD 19 抗体变体 VH16R94K/S324N-VL43V3Q/T7S/P44I/N92A 导致被处理小鼠的脾脏中 B 细胞耗尽, 对 GBR 抗体的响应与对 **Mabthera®** 的强度相当。

[0001]

序列表

<110> 格兰马克药品股份有限公司 (Glencmark Pharmaceuticals SA)

<120> 结合 CD19 的人源化抗体及其用途

<130> 17280/PCT

<160> 125

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FMC63 VH NCBI CAA74659

<400> 1

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

Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr
			20					25						30	

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

Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
			50				55						60		

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

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

Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
					100					105					110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[0002]

115

120

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> FMC63-VL NCBI-CAA74660

<400> 2

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 3
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> humIGKV087 [V1-5*03]

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0003]

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr			
	85	90	
<210> 4			
<211> 94			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> humIGKV106 [V1-27*01]			
<400> 4			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala			
	85	90	

[0004]

<210> 5
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> humIGKV115 [V1-39*01]

<400> 5

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr
 85 90

<210> 6
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> humIGKV094 [V1-12*01]

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

[0005]

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe
 85 90

<210> 7

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 供体扩增的 cDNA 克隆#39

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

[0006]

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 供体扩增的 cDNA 克隆#40

<400> 8

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

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

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

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

[0007]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 供体扩增的 cDNA 克隆#43

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

[0008]

20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65	70	75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu 85	90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala 130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 145	150	155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr 180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210		
<210> 10		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		

[0009]

210

<210> 11
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> humIGHV199 [V3-33*01]

<400> 11

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 12
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> humIGHV175 [V3-11*01]

<400> 12

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

[0011]

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

Ala Arg

- <210> 13
- <211> 98
- <212> PRT
- <213> 人工

- <220>
- <223> humIGHV195 [V3-30*18]

<400> 13

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

[0012]

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

Ala Arg

- <210> 14
- <211> 98
- <212> PRT
- <213> 人工

- <220>
- <223> humIGHV031 [V3-48*01]

- <400> 14

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

- <210> 15
- <211> 233
- <212> PRT
- <213> 人工

- <220>

[0013]

<223> 供体扩增的 cDNA 克隆#2

<400> 15

Glu 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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Ser Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Thr Asp Leu Leu Ala Ala Pro Thr Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr
100 105 110

Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu
130 135 140

Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln
145 150 155 160

Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn
165 170 175

Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly
180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met
195 200 205

Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly

[0014]

210	215	220
Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro		
225	230	
<210> 16		
<211> 228		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 供体扩增的 cDNA 克隆#5		
<400> 16		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
1	5	10
		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asp		
	20	25
		30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40
		45
Ser Tyr Ile Val Ser Ser Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55
		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
		80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
		95
Ala Gly Ala Gly Gly Leu Val Ser Ala Ala Gly Arg Ala Ala Pro Arg		
	100	105
		110
Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser		
	115	120
		125
Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp		
	130	135
		140
Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp		
145	150	155
		160

[0015]

Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser
 165 170 175

Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr
 180 185 190

Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu
 195 200 205

His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn
 210 215 220

Val Pro Leu Pro
 225

<210> 17

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 供体扩增的 cDNA 克隆#16

<400> 17

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

[0016]

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro
115 120 125

Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val
130 135 140

Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp
145 150 155 160

Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser
165 170 175

Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro
180 185 190

Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val
195 200 205

Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro
210 215 220

<210> 18
<211> 224
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 供体扩增的 cDNA 克隆#20

<400> 18

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

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

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

Ser Tyr Ile Val Ser Ser Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Val Ser Val

[0017]

	50		55		60															
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr																				
65			70		75															80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																				
			85		90															95
Ala Arg Gly Ser Ile Met Gly Ala Glu Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln																				
			100		105															110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu																				
			115		120															125
Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val																				
			130		135															140
Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe																				
			145		150															160
Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe																				
			165		170															175
Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu																				
			180		185															190
Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys																				
			195		200															205
Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro																				
			210		215															220
<210>	19																			
<211>	120																			
<212>	PRT																			
<213>	人工																			
<220>																				
<223>	VH2																			
<400>	19																			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg																				
1			5		10															15

[0018]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

Thr His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH5

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

[0019]

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

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

Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0020]

	115		120
<210>	22		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	VH20		
<400>	22		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr			
	20	25	30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210>	23		
<211>	112		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	VL39		

[0021]

<400> 23

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL40

<400> 24

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0022]

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

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

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

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43

<400> 25

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

[0023]

<213> 人工

<220>

<223> VL44

<400> 26

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HCDR1

<400> 27

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

[0024]

<213> 人工

<220>

<223> HCDR2

<400> 28

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HCDR3

<400> 29

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LCDR1

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LCDR2

[0025]

<400> 31

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LCDR3

<400> 32

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VII16-G42R

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

[0026]

	85	90	95
Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210>	34		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	VH16-F67L		
<400>	34		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr			
	20	25	30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210>	35		
<211>	120		

[0027]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R71K

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-L78V

<400> 36

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

[0028]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg 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 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

[0029]

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-P44V

<400> 38

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 39

[0030]

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VL43-F71Y

<400> 39

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VL43 Y87F

<400> 40

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

[0031]

	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys			
	100	105	
<210> 41			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> VL43-V3Q/T7S			
<400> 41			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr			
	85	90	95

[0032]

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 42
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VH16-Q6E

<400> 42

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 Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

[0033]

<223> VH16-Y32F/R94K

<400> 43

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Phe
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/Y96F

<400> 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

[0034]

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Phe Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/Y97F

<400> 45

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

[0035]

	85	90	95
Lys His Tyr Phe Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210>	46		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	VH16-R94K/Y98F		
<400>	46		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr	20	25	30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys	50	55	60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu	65	70	75
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	85	90	95
Lys His Tyr Tyr Phe Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210>	47		
<211>	120		

[0036]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/Y100bF

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-Y32F

<400> 48

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

[0037]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
20 25 30

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-P44I

<400> 49

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

[0038]

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VL43-P44L

<400> 50

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 51
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VL43-N92A

[0039]

<400> 51

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-T93V

<400> 52

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0040]

	50		55		60										
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Leu	Pro	Tyr
					85					90					95
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100							105					

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-T93A

<400> 53

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

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

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

Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55							60		

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

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

Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys
			100							105

<210> 54

<211> 120

[0041]

<212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> VH16-R94K/Y97W

 <400> 51

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

 Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

 Lys His Tyr Trp Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 55
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> VH16-Y32F/R94K/Y97F

 <400> 55

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

[0042]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Phe
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Phe Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-Y32F/P44I

<400> 56

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
 20 25 30

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0043]

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-V3Q/T7S/N92A

<400> 57

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

[0044]

<220>

<223> VL43-V3Q/T7S/Y32F/N92A

<400> 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
 20 25 30

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-V3Q/T7S/P44I/N92A

<400> 59

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile

[0045]

	35		40		45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro					
	65		70		75
					80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr					
		85		90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys					
		100		105	
<210>	60				
<211>	107				
<212>	PRT				
<213>	人工				
<220>					
<223>	VL43-V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A				
<400>	60				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
1		5		10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe					
		20		25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile					
	35		40		45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro					
	65		70		75
					80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr					
		85		90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys					
		100		105	

[0046]

<210> 61
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VL43-F71H

<400> 61

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VL43-F71S

<400> 62

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

[0047]

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-F71T

<400> 63

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

[0048]

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VH16-- R94K 重链

<400> 64

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

[0049]

145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	370	375	380

[0050]

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 65

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43— V3Q/T7S/P44I/N92A 轻链

<400> 65

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

[0051]

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 66

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-- R94K Y100BF 重链

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

[0052]

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

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

[0053]

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 67

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL43-- V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A 轻链

<400> 67

[0054]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FMC63 嵌合重链

<400> 68

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

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

[0056]

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

[0057]

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

Gly Lys
 450

<210> 69

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FMC63 嵌合轻链

<400> 69

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

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

[0058]

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 70

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> Table-1 Fwd 引物

<400> 70

gatcggatcc actggtgata ttgtgatgac ycagwtccc 39

<210> 71

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> Table-1 Rev 引物

<400> 71

gatcgggcc gcacactctc ccctgttgaa gctett 36

<210> 72

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> Table-2 Fwd 引物 I

[0059]

<400> 72	
gatcggatcc actggtgagg tgcagctggt ggagtc	36
<210> 73	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> Table-2 Rev 引物	
<400> 73	
gatcgcggcc gctggaagag gcacgttctt ttcttt	36
<210> 74	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> CMV-IE 正向	
<400> 74	
cgcaaatggg cggtaggcgt g	21
<210> 75	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> BGH 反向	
<400> 75	
tagaaggcac agtcgagg	18
<210> 76	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH2 mCDR1 接头反向	

[0060]

<400> 76		
gctcacgccg tagtcgggca ggetcacgcc agacgtgca caggagagtc tc		52
<210> 77		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VH2 mCDR1 接头正向		
<400> 77		
ggcgtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc tgggtccgcc aggetccagg		50
<210> 78		
<211> 61		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VH2 mCDR2 接头反向		
<400> 78		
ggcgtgttg tagtaggttg tctcggagcc ccagatcact gccaccact ccagccctt		60
g		61
<210> 79		
<211> 66		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VH2 mCDR2 接头正向		
<400> 79		
ggctccgaga caacctacta caacagcgc ctgaagagcc gattccat ctccagagac		60
aattcc		66
<210> 80		
<211> 51		
<212> DNA		

[0061]

<213> 人工	
<220>	
<223> VH2 mCDR3 接头反向	
<400> 80	
catggcgtag ctgccgccgt agtagtagtg tgtggtacag taatacacgg c	51
<210> 81	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH2 mCDR3 接头正向	
<400> 81	
cactactact acggcggcag ctacgccatg gactactggg gccagggaac cctg	54
<210> 82	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH5 mCDR1 接头反向	
<400> 82	
gctcacgccg tagtcgggca ggctcacgcc agaggtgca caggagagtc tc	52
<210> 83	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH5 mCDR1 接头正向	
<400> 83	
ggcgtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc tggatccgcc aggctccagg g	51
<210> 84	
<211> 66	
<212> DNA	

[0062]

<213> 人工	
<220>	
<223> VH5 mCDR2 接头正向	
<400> 84	
ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcacat ctccaggac	60
aacgcc	66
<210> 85	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH5 mCDR3 接头反向	
<400> 85	
gtagtccatg gcgtagctgc cgccgtagta gtagtgcccc gcacagtaat aaacggc	57
<210> 86	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH5 mCDR3 接头正向	
<400> 86	
cactactact acggcggcag ctacgccatg gactactggg gccagggaac cctggtcacc	60
<210> 87	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH16 mCDR3 接头反向	
<400> 87	
catggcgtag ctgccgccgt agtagtagtg tctcgcacag taatacacgg c	51
<210> 88	

[0063]

<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH20 mCDR1 接头反向	
<400> 88	
gctcacgccg tagtcgggca ggctcacgcc agaggctaca caggagagtc tc	52
<210> 89	
<211> 61	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH20 mCDR2 接头反向	
<400> 89	
ggcgctgttg tagtaggttg tctcggagcc ccagatcaact gaaacccact ccagcccctt	60
c	61
<210> 90	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH20 mCDR2 接头正向	
<400> 90	
ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcacat ctccagagac	60
aacgcc	66
<210> 91	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH20 mCDR3 接头反向	

[0064]

<400> 91	
catggcgtag ctgccgccgt agtagtagtg tctcgcacag taatacacag c	51
<210> 92	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> SalI 衔接子	
<400> 92	
gatcgtcgac gctgaggaga cggtgaccag gg	32
<210> 93	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> HindIII VJ2C 正向	
<400> 93	
gatcaagctt gccgccacca tggagacaga cacactc	37
<210> 94	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VL39 mCDR2 接头正向	
<400> 94	
cacaccagcc ggctgcacag cgggggtcca tcaaggttca gcggc	45
<210> 95	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VL39 mCDR3 接头反向	

[0065]

<400> 95		
gggtgtaggce agtgtgttgc cttgctggca gtaataagtt gcaaaatcat c		51
<210> 96		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL39 mCDR3 接头正向		
<400> 96		
cagcaaggea acacaactgcc ctacaccttc ggccaaggga ccaaggtgg		49
<210> 97		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL40 mCDR2 接头反向		
<400> 97		
getgtgcage cggctggtgt gatagatcag gaggttagga ac		42
<210> 98		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL40 mCDR2 接头正向		
<400> 98		
cacaccagec ggctgcacag cggggtceca tctcggttca ggggc		45
<210> 99		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL40 mCDR3 接头反向		

[0066]

<400> 99		
ggtgtagggc agtgtgttgc cttgctgaca gtaataagtt gcaaaatctt c		51
<210> 100		
<211> 48		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL40 mCDR3 接头正向		
<400> 100		
cagcaaggea acacaactgcc ctacaccttc ggccggaggga ccaaggtg		48
<210> 101		
<211> 57		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL43 mCDR1 接头反向		
<400> 101		
gttcaggtac ttgctgatgt cctggctggc ccggcaagtg atggtgactc tgtctcc		57
<210> 102		
<211> 54		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL43 mCDR1 接头正向		
<400> 102		
egggccagec aggacatcag caagtacctg aactggatc agcagaaacc aggg		54
<210> 103		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL43 mCDR2 接头反向		

[0067]

<400> 103		
gctgtgcage cggctggtgt gatagatcag gagcttaggg gc		42
<210> 104		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL43 mCDR2 接头正向		
<400> 104		
cacaccagec ggctgcacag cggggtocca tcaaggttca gtggc		45
<210> 105		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL43 mCDR3 接头反向		
<400> 105		
ggtgtagggc agtgtgttgc cttgctgaca gtagtaagtt gcaaaatctt c		51
<210> 106		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL43 mCDR3 接头正向		
<400> 106		
cagcaaggea acacaactgcc ctacaccttc ggccctggga ccaaagtgg		49
<210> 107		
<211> 57		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> VL44 mCDR1 接头反向		

[0068]

<400> 107	
gttcaggtac ttgctgatgt cctggctggc cgcacaagtg atggtgactc tgtctcc	57
<210> 108	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VL44 mCDR2 接头反向	
<400> 108	
gctgtgcage cggctggtgt gatagatcag gaggttaggg gc	42
<210> 109	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VL44 mCDR2 接头正向	
<400> 109	
cacaccagec ggctgcacag cggggtccca tcaaggttca gcggc	45
<210> 110	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VL44 mCDR3 接头反向	
<400> 110	
ggtgtaggge agtgtgttgc cttgctgaca ataataagtt gcaaaatctt c	51
<210> 111	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VL44 mCDR3 接头正向	

[0069]

<400> 111
cagcaaggca acacactgcc ctacaccttt ggccagggga ccaagttgg 49

<210> 112

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> Not1 Kappa

反向

<400> 112
gatcggggcc gttatcaac actctcccct gttgaagc 38

<210> 113

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> Table 2 Fwd 引物 II

<400> 113
gatcggatcc actggtcagg tycagctkgt gcagtctgg 39

<210> 114

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/S298A 重链

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0070]

35	40	45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys 50	55	60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala 130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser 145	150	155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val 165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro 180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys 195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp 210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly 225	230	235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 260	265	270

[0071]

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 115
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VH16-R94K/E269D/S298A 重链

[0072]

<400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

[0073]

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Asp
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

[0074]

<210> 116
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VH16-R94K/S298A/S324N 重链

<400> 116

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

[0075]

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

[0076]

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

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

Gly Lys
 450

<210> 117

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/E269D/S298A/S324N 重链

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

[0077]

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Asp
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

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

[0078]

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 118

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/S324N 重链

<400> 118

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

[0079]

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

[0080]

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 119

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/K274Q 重链

<400> 119

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

[0081]

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

[0082]

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 120
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> VH16-R94K/N276K 重链

[0083]

<400> 120

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

[0084]

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 215 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys

[0085]

450

<210> 121

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH16-R94K/K334R 重链

<400> 121

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

[0086]

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

[0087]

	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
Gly Lys			
	450		
<210>	122		
<211>	450		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	VII16-R94K/K274Q/N276K 重链		
<400>	122		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr			
	20	25	30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125

[0088]

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

[0089]

	355		360		365										
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
	370					375								380	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
385						390				395					400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405						410					415
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420						425					430
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
		435						440							445
Gly	Lys														
	450														
<210>	123														
<211>	450														
<212>	PRT														
<213>	人工														
<220>															
<223>	VH16-R94K/K274Q/N276K/K334R 重链														
<400>	123														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5						10				15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr
			20						25					30	
Gly	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40							45	
Ala	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
	50						55							60	
Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65							70				75				80

[0090]

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

[0091]

305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	325	330	335
Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	435	440	445
Gly Lys	450		
<210>	124		
<211>	450		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	VH16-R94K(1133) 重链		
<400>	124		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr	20	25	30

[0092]

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

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[0093]

260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys		
450		
<210> 125		
<211> 556		
<212> PRT		
<213> 人 (Homo sapiens)		
<220>		

[0094]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(556)
 <223> 人CD19

 <400> 125

 Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
 1 5 10 15

 Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
 20 25 30

 Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
 35 40 45

 Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
 50 55 60

 Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
 65 70 75 80

 Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
 85 90 95

 Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
 100 105 110

 Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
 115 120 125

 Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
 130 135 140

 Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
 145 150 155 160

 Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
 165 170 175

 Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
 180 185 190

 Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
 195 200 205

[0095]

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
 210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
 225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
 245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
 260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
 290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
 385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
 420 425 430

Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly

[0096]

435	440	445
Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu		
450	455	460
Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser		
465	470	475
480		
Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly		
	485	490
		495
Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln		
	500	505
		510
Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala		
	515	520
		525
Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp		
	530	535
		540
Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg		
	545	550
		555

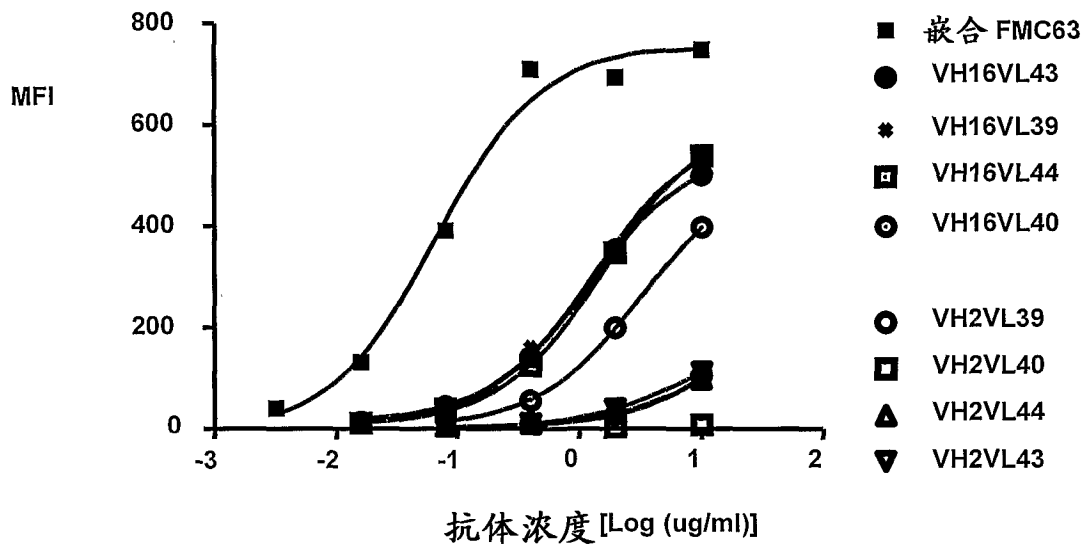


图 1A

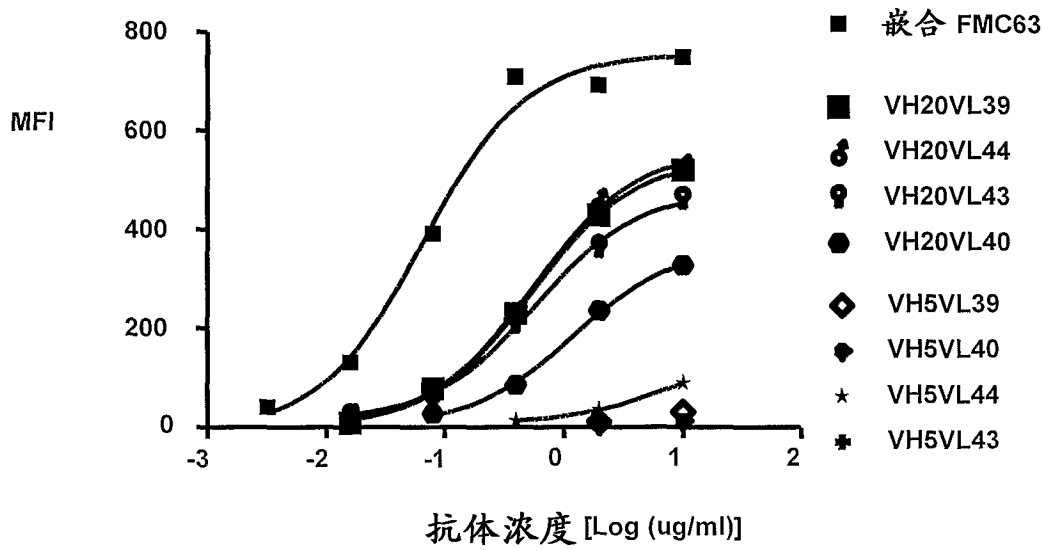


图 1B

```

          10          20          30          40          50          60
Kabat VL#
SEQ ID No: 2 FMC63 VL
SEQ ID No: 3 [V1-5*03]
SEQ ID No: 4 [V1-27*01]
SEQ ID No: 5 [V1-39*01]
SEQ ID No: 6 [V1-12*01]
SEQ ID No: 23 (VL39)
SEQ ID No: 24 (VL40)
SEQ ID No: 25 (VL43)
SEQ ID No: 26 (VL44)
          70          80          90          100
Kabat VL#
SEQ ID No: 2 FMC63 VL
SEQ ID No: 3 [V1-5*03]
SEQ ID No: 4 [V1-27*01]
SEQ ID No: 5 [V1-39*01]
SEQ ID No: 6 [V1-12*01]
SEQ ID No: 23 (VL39)
SEQ ID No: 24 (VL40)
SEQ ID No: 25 (VL43)
SEQ ID No: 26 (VL44)

```

图 2A

```

          10          20          30          40          50          60
Kabat VH#
SEQ ID No: 1 FMC63 VH
SEQ ID No: 11 [V3-33*01]
SEQ ID No: 12 [V3-11*01]
SEQ ID No: 13 [V3-30*18]
SEQ ID No: 14 [V3-48*01]
SEQ ID No: 19 (VH2)
SEQ ID No: 20 (VH5)
SEQ ID No: 21 (VH16)
SEQ ID No: 22 (VH20)
          70          80          90          100          110
Kabat VH#
SEQ ID No: 1 FMC63 VH
SEQ ID No: 11 [V3-33*01]
SEQ ID No: 12 [V3-11*01]
SEQ ID No: 13 [V3-30*18]
SEQ ID No: 14 [V3-48*01]
SEQ ID No: 19 (VH2)
SEQ ID No: 20 (VH5)
SEQ ID No: 21 (VH16)
SEQ ID No: 22 (VH20)

```

图 2B

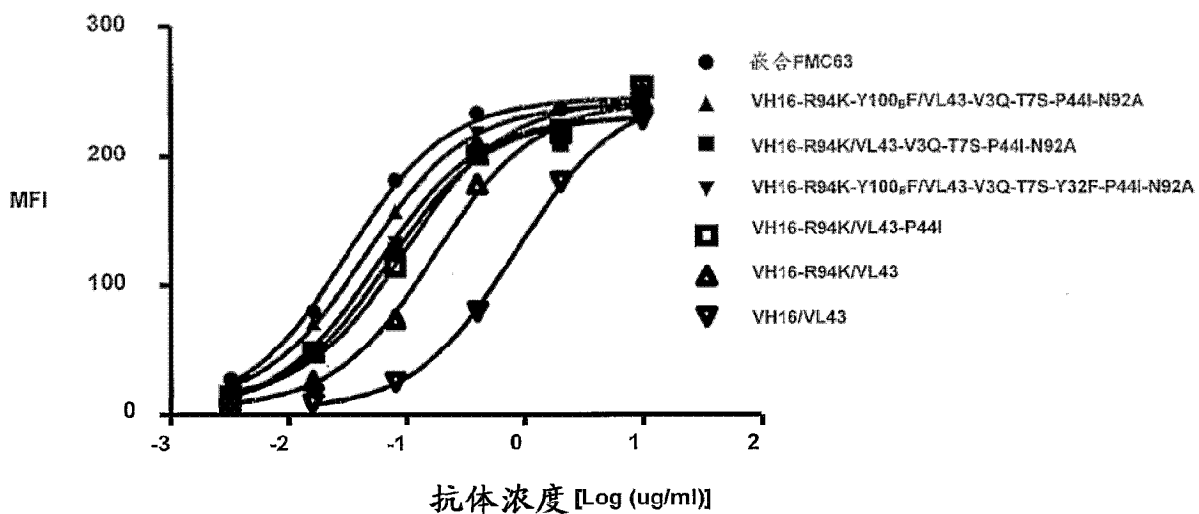


图 3

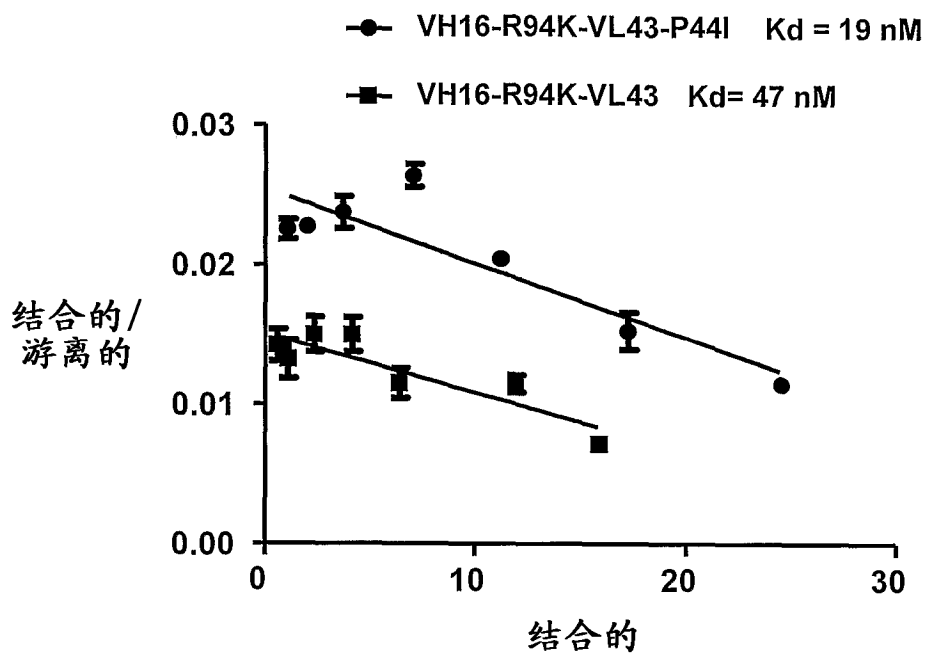


图 4A

- ▲ Eu-VH16-R94K-Y100_BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A $K_d = 10.9$ nM
● Eu-嵌合-FMC63 $K_d = 11.8$ nM

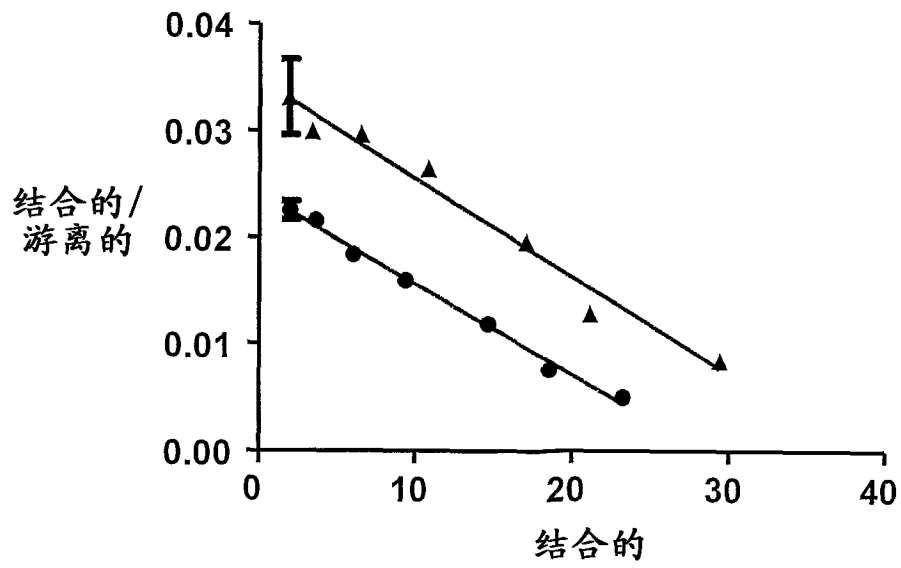
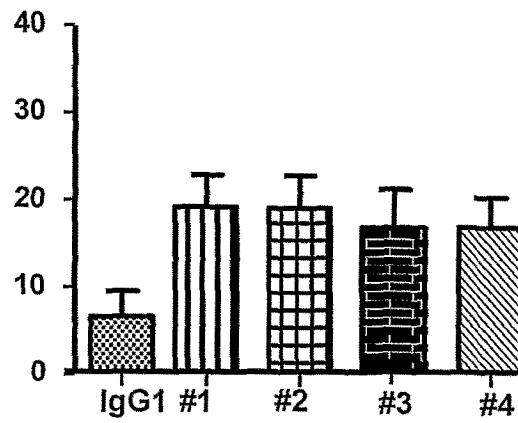


图 4B

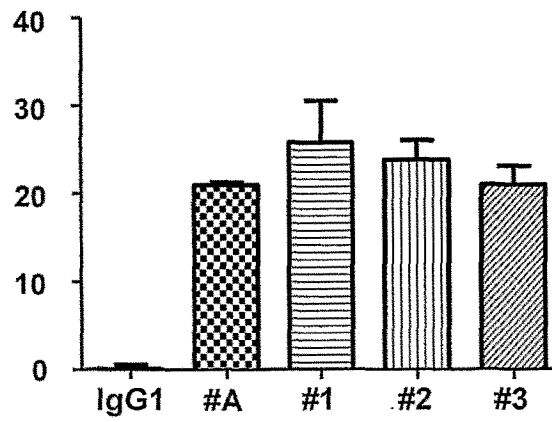
特异性裂解的% (ADCC)



Keys	
同种型对照IgG1	IgG1
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#3
VH16-R94K/VL43-P44I	#4

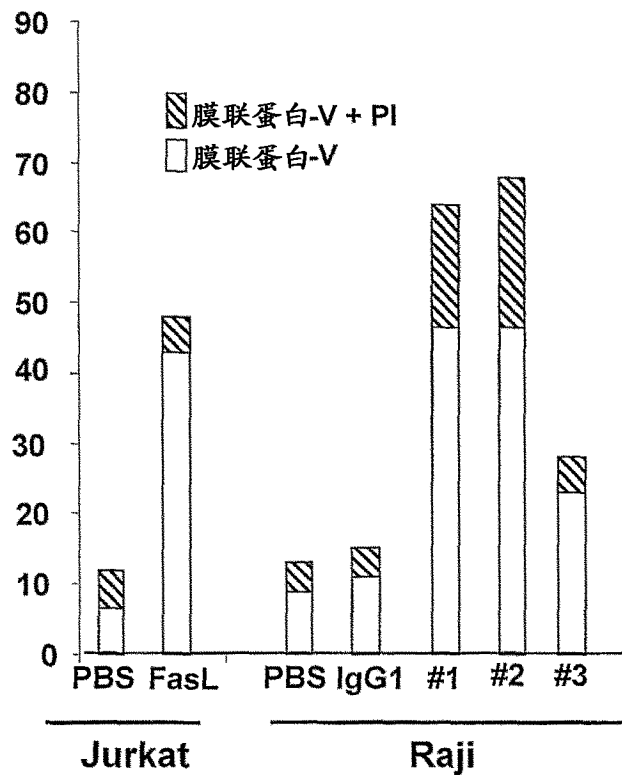
图 5A

特异性裂解的% (ADCC)



Keys	
同种型对照IgG1	IgG1
Chimeric FMC63	#A
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#3

图 5B



Keys	
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#1
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
嵌合 FMC63	#3

图 6

处理的和未处理的细胞之间的%差异

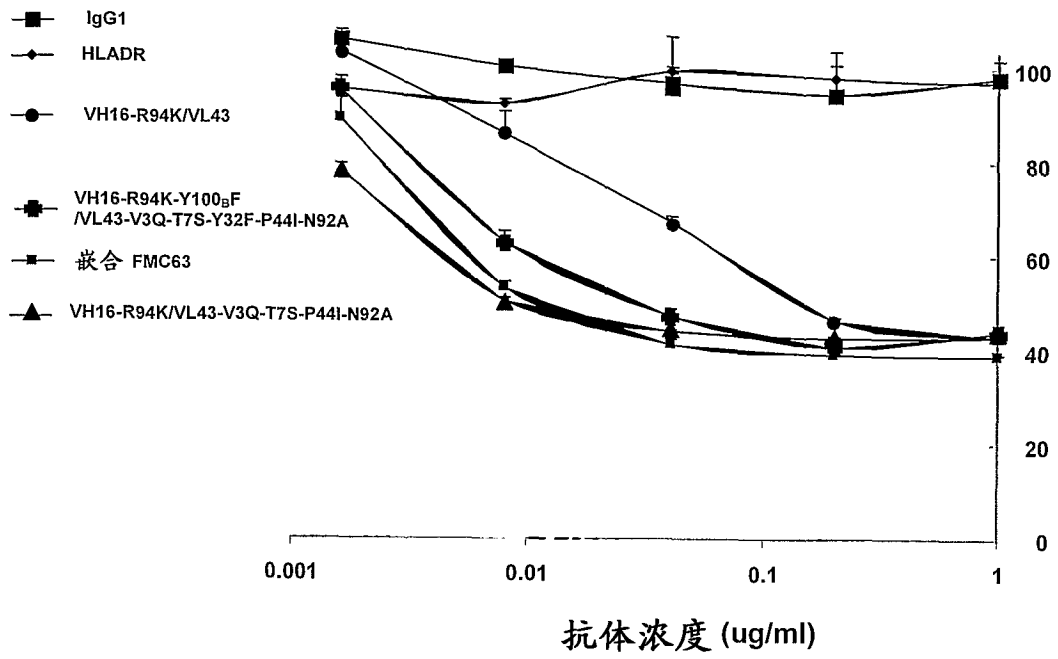
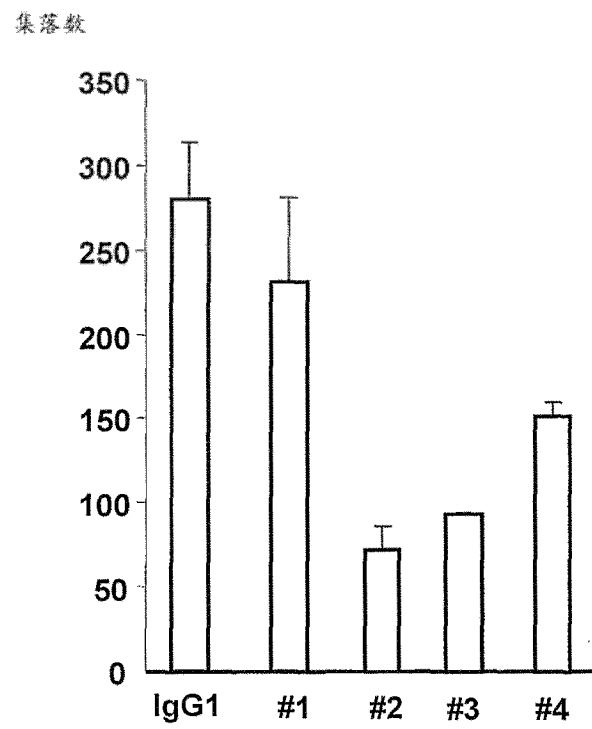


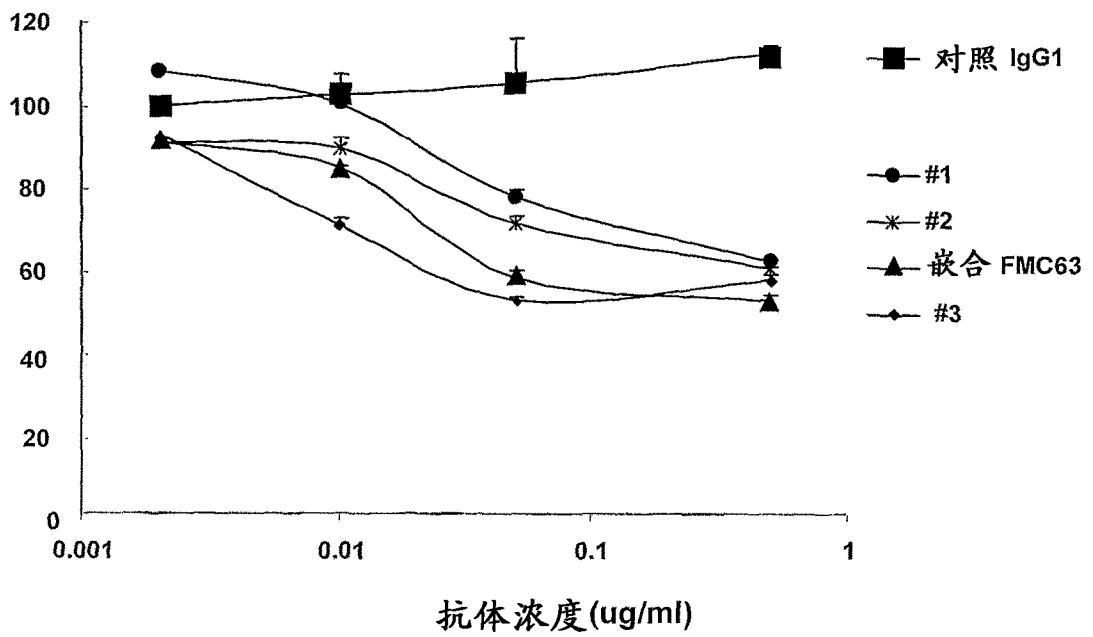
图 7A



Keys	
嵌合 FMC63	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#3
VH16-R94K/VL43-P44I	#4

图 7B

处理的和对照细胞之间的%差异



Keys	
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#1
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#3

图 8

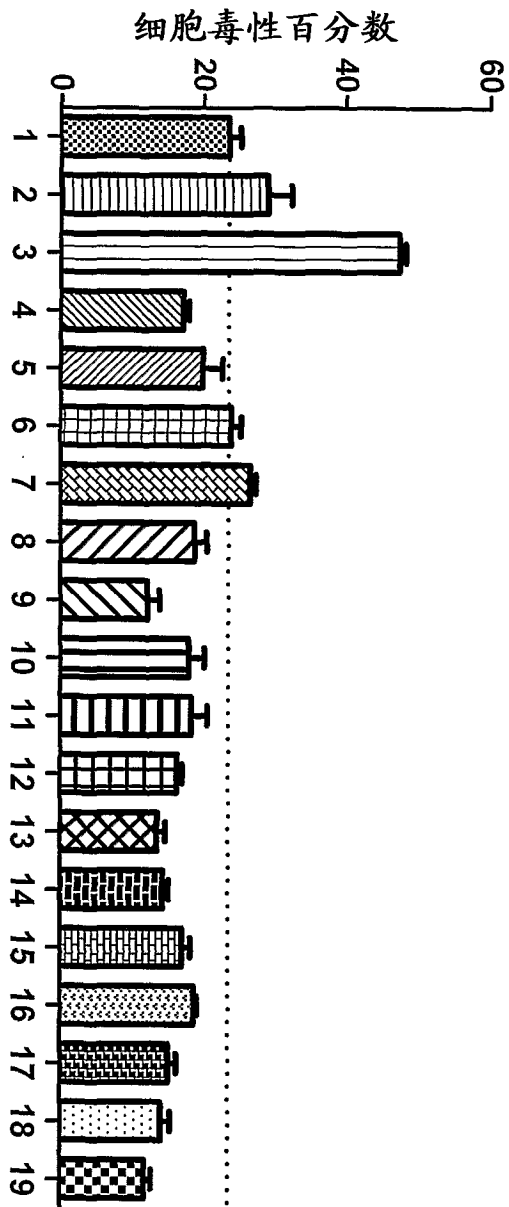


图 9

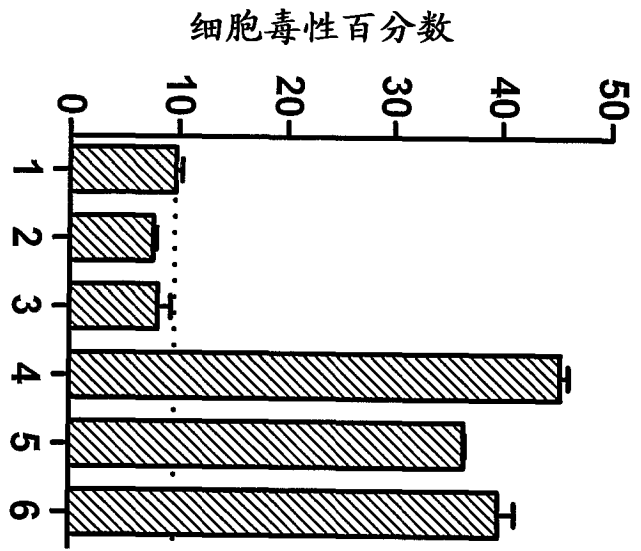


图 10

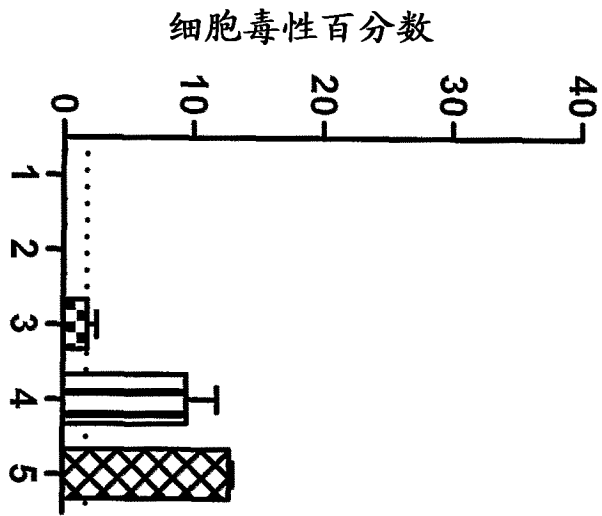


图 11

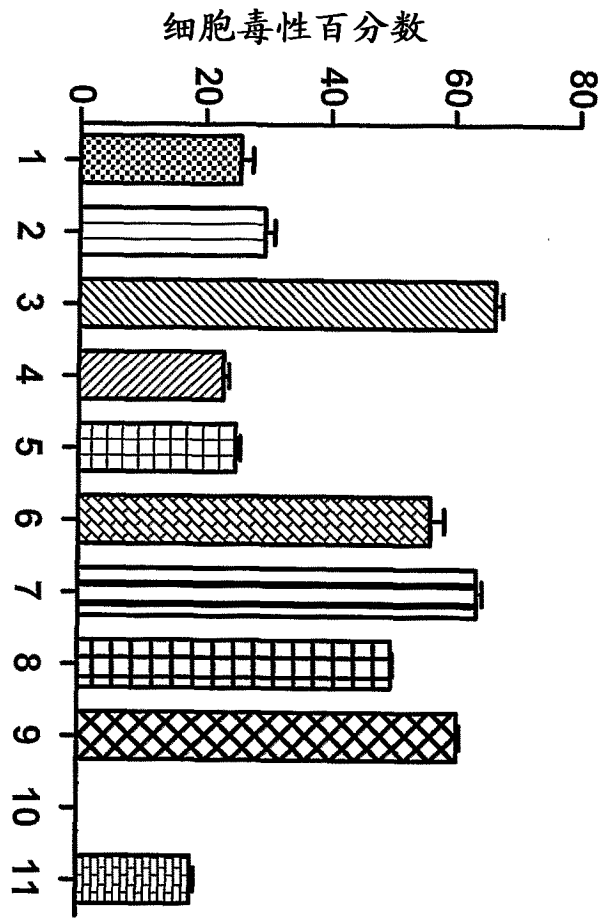


图 12

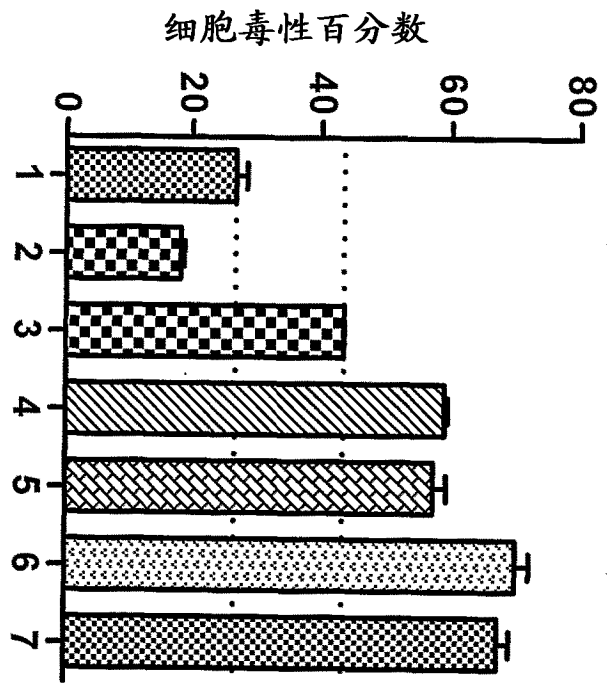


图 13

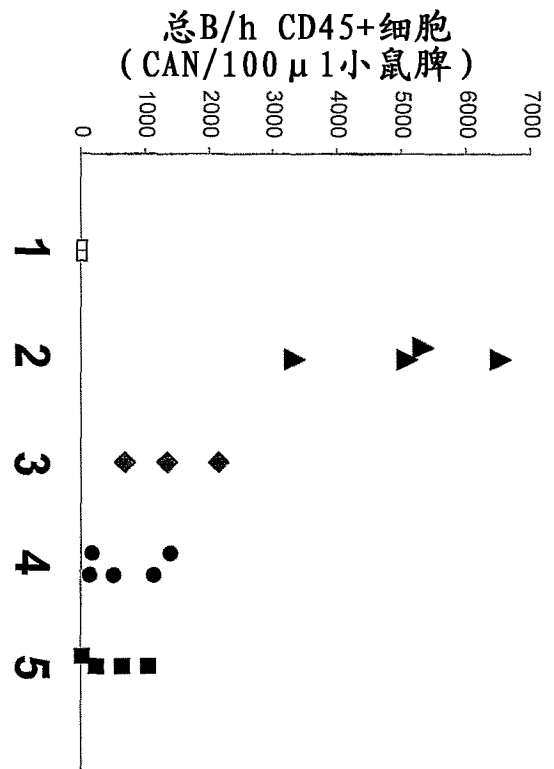


图 14

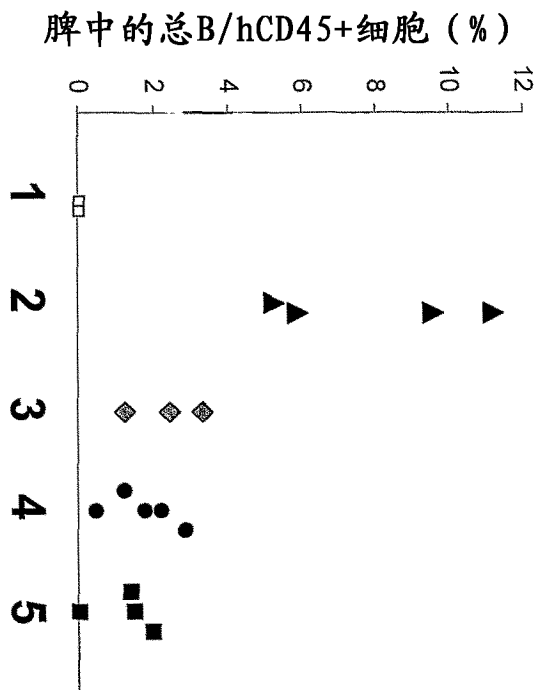


图 15