



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0008080
(43) 공개일자 2015년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
<i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01)	바이오아트라, 엘엘씨
<i>C12P 21/08</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)	미국, 캘리포니아 92121, 샌디에이고, 토레야나 로드 11011
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)	
(21) 출원번호 10-2014-7030515	(72) 발명자
(22) 출원일자(국제) 2013년04월26일	쇼트, 제이
심사청구일자 없음	미국, 캘리포니아 92014, 텔 마, 비아 에스페리아 12985
(85) 번역문제출일자 2014년10월30일	프레이, 거하드
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/038370	미국, 캘리포니아 92129, 샌디에고, 비아 키마 벨 라 13768
(87) 국제공개번호 WO 2013/163519	
국제공개일자 2013년10월31일	(뒷면에 계속)
(30) 우선권주장	(74) 대리인
61/638,834 2012년04월26일 미국(US)	박경재

전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 항-CD22 항체

(57) 요 약

적어도 하나의 항-CD22 항체를 암호화하는 분리된 핵산을 포함하는 항-CD22 항체, 벡터, 숙주 세포, 유전자이식 동물 또는 식물, 및 치료학적 조성물, 방법 및 장치를 포함하는 이의 제조 방법 및 사용 방법이 기재되어 있다.

대 표 도 - 도1

SEQ ID NO:1
VM1000 LC
GAAATTGTGTTGACACAGCTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCC
TGCAAGTCAGTCAAAGTGTTTATACAGTGAGTGAGAAGACTACTTGCCCTGGTATCAGCA
GAAACCCAGGGAAAGCTCTAAGCTCCCTGATCTATGGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGGTCCCCAT
GAGGGTTCAGTGGAAAGTGGAATCTGGGACAGATTTACTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCCTGAA
GATATTGCAACATATTACTGTAAGCAATACTCTCCTCTGGACGTTGGCAGCAAGGG

SEQ ID NO:17
VM1000 LC
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRERGVPSRFS
GSGSGTDFDTFTISSLQPEDIATYYCKQYLSSWTFGQG

SEQ ID NO:33
VM1000 HC
CAGGTTTCAGCTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCC
CAAGGCTTCTGGCTACGTTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGATCAGGCACTCCCCATCGAGAGG
CCTTGAGTGGCTGGGTTACATTAATCCTAGGAATGATTATACTGAGTACAATCGGATTITCAAGGG
GAGACTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCCAGGGTCCCTACAATGACCAACATGGACC
CTGTGGACACAGCCACGTATTACTGTGCAAGAAGGGGGATTACTACGTTACTGGGGCAGGGA

SEQ ID NO:49
VM1000 HC
QVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGR
LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARRGIFTYWGQG

(72) 발명자

창, 화이, 웬

미국, 캘리포니아 92069, 샌 마르코스, 새도우 힐
스 드라이브 1318

보일, 윌리엄

미국, 캘리포니아 90265-6628, 말리부, 말리부 콜
로니 로드 23629

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 또는 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 서열 번호 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 또는 32의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 및 하나 이상의 사람 항체로부터 기원한 고정 영역을 포함하는, 사람 CD22에 결합하는 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 2

VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015 중의 하나 이상으로부터의 가변 영역으로부터 기원한 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역들(CDRs), 및 하나 이상의 사람 항체로부터 기원한 고정 영역을 포함하는, 사람 CD22에 결합하는 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 단편이 항 CD22 쥐 항체의 사람 CD22에 대한 결합을 생체내에서 경쟁적으로 억제하는, 항체 또는 단편.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 명시된 부위 또는 변이체가 적어도 10^{-9} M의 친화성(K_d)으로 CD22에 결합하는, 항-CD22 항체 또는 항체 단편.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 명시된 부위 또는 변이체가 적어도 10^{-11} M의 친화성(K_d)으로 CD22에 결합하는, CD22 항체 또는 항체 단편.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 명시된 부위 또는 변이체가 적어도 10^{-12} M의 친화성(K_d)으로 결합하는, CD22 항체 또는 항체 단편.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 명시된 부위 또는 변이체가 적어도 하나의 CD22의 적어도 하나의 활성을 실질적으로 중화하는, CD22 항체 또는 항체 단편.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 따른 분리된 CD22 항체 또는 명시된 부위 또는 변이체, 및 담체 또는 희석제를 포함하는, CD22 항체 조성물 또는 항체 단편 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 따른 적어도 하나의 항-CD22 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나의 선택된 면역 조절 유효량을 세포, 조직, 기관 또는 동물과 접촉시키거나 이에 투여함을 포함하여, 상기 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 면역 상태, 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 면역 상태, 질환 또는 질병이 류마티스 관절염/혈청음성치료요법, 골관절염, 염증성 창자병, 전신 홍반 루푸스, 홍채 모양체염/포도막염/시신경염 중에서 선택된 하나 이상인, 상기 세포, 조직, 기관 또는

동물에서 면역 상태, 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 유효량이 상기 세포, 조직, 기관 또는 동물의 0.0001 내지 50mg/kg인, 상기 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 면역 상태, 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 따른 약제학적 유효량의 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물 또는 항체 단편을 세포, 조직, 기관 또는 동물에 접촉시키거나 투여함을 포함하는, 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 암 질환 또는 상태를 조절하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 암 질환 또는 상태가 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL), B-세포, T-세포 또는 FAB ALL, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수구성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈구(CLL), 모발 세포 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS), 림프종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 악성 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 및 다발 골수종으로부터 선택된 하나 이상인, 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 암 질환 또는 상태를 조절하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 유효량이 0.01 내지 100mg/kg의 상기 세포, 조직, 기관 또는 동물인, 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 암 질환 또는 상태를 조절하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 접촉 또는 상기 투여가 정맥내, 근육내, 덩어리로(bolus), 피하, 호흡기, 흡입, 질내, 직장내, 볼내(buccal), 설하, 비강내 또는 경피 중에서 선택된 하나 이상의 방식인, 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 암 질환 또는 상태를 조절하는 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 따른 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물 또는 항체 단편을 포함하고, 적어도 하나의 CD22 항체 조성물 또는 항체 단편을 정맥내, 근육내, 덩어리로, 피하로, 호흡기로, 흡입으로, 질내, 직장내, 볼내, 설하, 비강내 또는 경피 중에서 선택된 적어도 하나의 방식에 의해 접촉시키거나 투여하기에 적합한, 의료 장치.

청구항 17

항체 또는 명시된 부위 또는 변이체가 제1항 또는 제2항에 따른 항-CD22 항체 또는 단편과 동일한 에피토프 또는 항원성 영역에 결합하는, 분리된 완전한 사람 항체 조성물 또는 항체 단편.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 따른 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물 또는 항체 단편, 및 멸균수, 멸균 완충된 물 중에서 선택된 적어도 하나의 담체, 또는 폐놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 폐닐머큐리 니트라이트, 폐녹시에탄올, 포름알데하이드, 클로로부탄올, 염화마그네슘, 알킬파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이의 혼합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 방부제를 포함하는, 제형.

청구항 19

제18항에 있어서, 항-CD22 항체 조성물 또는 항체 단편의 농도가 약 0.1mg/ml 내지 약 100mg/ml인, 제형.

청구항 20

제18항에 있어서 등장성 제제를 추가로 포함하는, 제형.

청구항 21

제18항에 있어서, 생리학적으로 허용되는 완충제를 추가로 포함하는, 제형.

청구항 22

제1 용기 속에 동결건조된 형태의 제1형 또는 제2형에 따른 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물 또는 항체 단편, 및 멜균수, 멜균 완충된 물, 또는 수성 희석액 중의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 페닐머큐릭 니트라이트, 페녹시에탄올, 포름알데하이드, 클로로부탄올, 염화마그네슘, 알킬파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 나트륨 테하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이의 혼합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 방부제를 포함하는 임의의 제2의 용기를 포함하는, 키트(kit).

청구항 23

제22항에 있어서, 항-CD22 항체 조성물 또는 항체 단편이 약 0.1mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도로 재구성되는, 키트.

청구항 24

제22항에 있어서 등장성 제제를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 25

제22항에 있어서, 생리학적으로 허용되는 완충제를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 26

제18항에 따른 제형을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는, 적어도 하나의 항-CD22 매개된 상태를 치료하는 방법.

청구항 27

제1항 또는 제2항에 따른 적어도 하나의 CD22 항체 조성물 또는 항체 단편의 용액 또는 동결건조된 형태를 포함하는 용기 및 포장재를 포함하는, 사람 약제학적 용도를 위한 제조 제품.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 용기가 다중 사용 투여를 위한 마개를 갖는 유리 또는 플라스틱 용기인 제조 제품.

청구항 29

항-CD22 항체 또는 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 형질전환된 숙주 세포 또는 유전자이식 동물 또는 유전자이식 식물 또는 식물 세포로부터 상기 항체 또는 단편을 발현시키는 단계 및 이로부터 상기 항체 또는 단편을 회수하는 단계를 포함하여, 제1항 또는 제2항에 따른 항-CD22 항체 또는 단편을 생산하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 세포, 식물 세포 또는 효모 세포인, 항-CD22 항체 또는 단편을 생산하는 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 유전자이식 동물이 포유동물인, 항-CD22 항체 또는 단편을 생산하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 유전자이식 포유동물이 염소, 소, 양, 말, 및 비-사람 영장류로부터 선택되는, 항-CD22 항체 또는 단편을 생산하는 방법.

청구항 33

제1항 또는 제2항에 따른 적어도 하나의 항체를 발현할 수 있는, 유전자이식 동물 또는 식물.

청구항 34

제29항에 따른 방법으로 생산된 적어도 하나의 항-CD22 항체 또는 명시된 부위 또는 변이체.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 적어도 하나의 CD22 단백질에 대해 특이적인 구체적인 부위 또는 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 단편, 및 또한 이러한 항-CD22 항체를 암호화하는 핵산, 상보성 핵산, 백터, 숙주 세포, 및 치료학적 제형을 포함하는 이의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] CD22는 시글렉(Siglec), 시알산 결합 수용체 단백질 상과(superfamily)의 구성원이며, 발달중인 B 세포에 의해 생산된다. 생체내에서, B 세포는 CD22의 주요 공급원을 나타낸다. 림프종, 백혈병 및 림프구 B 세포와 같은 다른 세포 또한 CD22를 생산한다. CD22는 비-호지킨 림프종 및, 급성 및 만성 둘 다의 림프구 백혈병 암 진행에 대한 예후 인자로서 관련되어 있다. CD22 생산은 림프절의 배 중심에서 B-세포 분화 공정에 의해 조절될 수 있다.

[0003] 시알산 함유 세포의 표면 분자인, CD22 리간드는 체액성 면역 반응 동안 B 세포를 개발하는데 있어서 발현된 CD22 수용체에 결합할 수 있다. CD22 수용체는 CD22-리간드 결합에 관여하는 면역글로불린-유사 반복 서열을 갖는다.

[0004] CD22의 적어도 2개의 주요 생물학적 기능이 존재한다: CD22는 B 세포 수용체 복합체(BCR)와 상호작용하여 세포 시그널링을 자극함으로써 B 세포 분화 및 면역글로불린의 생산을 자극하고, 또한 BCR과 상호작용하여 세포 시그널링과 세포 성장 및 분화를 억제할 수 있다. 쥐 모노클로날 항-CD22 항체의 결합은 CD22 타이로신 인산화를 자극하여 유사분열촉진 시그널 형질도입을 부정적으로 조절한다(참조: Carnahan et al., Cancer Res September 1, 2003 9; 3982s)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 림프종, 급성 및 만성 백혈병 및 다른 B-세포 형성장애 및 B-세포 의존적 자가면역병과 관련된 상태를 예방하거나, 치료하거나, 완화시키거나, 진단하는데 사용하기 위한 CD22에 대한 고 친화성의, 중화 키메라 또는 사람 항체 또는 이의 단편을 제공하는 것이 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 당해 분야에 공지된 것과 조합된, 본원에 기술되고 가능하도록 한 바와 같은, 고 친화성 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 항-CD22 항체로부터 기원한 적어도 하나의 항원 결합 영역을 갖는, 분리되고 사람화된, 항-CD22 항체, 및 또한 이와 관련된 항-CD22 항체 조성물, 이들 항-CD22 항체의 접합된 버전, 암호화 또는 상보성 핵산, 백터, 숙주 세포, 조성물, 제형, 장치, 유전자이식 동물, 유전자이식 식물, 및 이의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 항체는 사람 CD22를 고 친화성으로 특이적으로 중화시킨다.

[0007] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 적어도 하나의 분리된 항-CD22 항체를 제공한다. 본 발명에 따른 항체는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 중의 어느 하나, 또는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 중의 어느 하나로부터 기원한, 이의 중쇄 또는 경쇄 또는 리간드 결합 부위의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)(예를 들면, CDR1, CDR2 또는 CDR3)과 함께 본 발명의 항체내로 흡입될 수 있는, 중쇄 또는 경쇄 고정 영역, 골격 영역, 또는 이의 어느 부위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은, 쇄의 각각이 사람 CD22에 대해 특이성을 갖는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011,

VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM 1015 중의 하나 이상으로부터 기원한 사람 고정 영역의 적어도 일부 및 가변 영역(v)의 적어도 일부를 포함하는, 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항-CD22 항체에 관한 것이며, 당해 항체는 고 친화성으로 결합하여 사람 CD22의 억제 및/또는 중화 에피토프에 결합한다. 본 발명은 또한 중쇄 고정, 연결, 다양성 또는 가변 영역, 또는 경쇄 고정, 연결 또는 가변 영역과 같은 항체 쇄의 하나 이상의 부위와 같은, 이러한 항체의 단편 또는 유도체를 포함한다.

[0008] 항체는 (본원에 정의된 것으로서) 항-CD22 항체로부터 기원한 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)(예를 들면, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3) 및/또는 적어도 하나의 고정 또는 가변 골격 영역 또는 이의 특정 부위를 포함할 수 있다. 항체 아미노산 서열은 또한 본원에 기술된 바와 같거나 당해 분야에 공지된, 적어도 하나의 특정의 치환, 삽입 또는 결실을 임의로 포함할 수 있다.

[0009] 본 발명의 바람직한 항체는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015, 및 이의 단편 및 영역을 포함한다.

[0010] 하나의 구현예에서, 본 기재내용은 서열 번호(SEQ ID NO) 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 또는 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 서열 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 또는 32의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 및 하나 이상의 사람 항체로부터 기원한 고정 영역을 포함하는, 사람 CD22에 결합하는 분리된 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 하나의 국면에서, 본 기재내용은 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015 중의 하나 이상으로부터의 가변 영역으로부터 기원한 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 하나 이상의 사람 항체로부터 기원한 고정 영역을 포함하는 사람 CD22에 결합하는 분리된 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 다른 국면에서, 본 기재내용은 특허청구범위의 청구항 제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 단편을 제공하며, 여기서 상기 항체 또는 단편은 항 CD22 쥐 항체의 사람 CD22에 대한 결합을 생체내에서 경쟁적으로 억제한다.

[0011] 본 발명의 바람직한 항체는 사람 CD22에 결합하며 CD22 타이로신 인산화 및 내부화를 유도하며 B 세포 성장 및 분화를 부정적으로 조절하는 것들이다. 모노클로날 항체 특이성 및 경쟁적 억제에 의한 친화성을 측정하기 위한 바람직한 방법은 본원에 참조로 본원에 혼입된 문헌(참조: Harlow, et al, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988)에서 찾을 수 있다. 본 발명의 적어도 하나의 항체는 문헌[참조: Stein R, Belisle E, Hansen HJ, Goldenberg DM: Epitope specificity of the anti-(B cell lymphoma) monoclonal antibody, LL2. Cancer Immunol Immunother 1993, 37:293-298.]에 기술된 바와 같이, 사람 CD22 단백질, 이의 소단위, 단편, 일부 또는 어떠한 조합에 대해 특이적인 적어도 하나의 특수한 에피토프에 결합한다. 모노클로날 항체 LL2는 CD22의 세포외 도메인내 제3의 면역글로불린(Ig) 반복 서열에 결합하며 CD22를 발현하는 B 세포 집단과 텁프종 및 백혈병 세포에서 이의 조절 효과에 중요하다. 에피토프는 적어도 하나의 항체 결합 영역을 포함할 수 있으며, 당해 에피토프는 바람직하게는 사람 CD22 단백질의 적어도 하나의 기능성, 세포외, 가용성, 친수성, 외부 또는 세포질성 도메인, 또는 이의 어떠한 일부와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 이의 적어도 하나의 일부의 적어도 1 내지 5개의 아미노산으로 바람직하게 구성된다.

[0012] 하나의 국면에서, 본 발명은 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015 중 하나로부터의 적어도 하나의 가변 영역 및 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-CD22 항체를 제공한다.

[0013] 다른 국면에서, 본 발명은 (i) VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015로부터 기원한 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 아미노산 서열 모두 및 이들을 암호화하는 핵산 서열; 또는 (ii) VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015로부터의 경쇄 CDR 아미노산 서열 모두 및 이들을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-CD22 항체를 제공한다.

[0014] 다른 국면에서, 본 발명은 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015로부터 기원한 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄 CDR 및 이들을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-CD22 항체를 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 국면은 적어도 하나의 사람 CDR을 포함하거나, 사람 CDR을 포함하지 않는, 적어도 하나의 분리된 포유동물 키메라, 사람화된 또는 CDR-이식된 항-CD22 항체를 제공하며, 여기서 당해 항체는 사람 CD22의 에피토프의 적어도 1 내지 3개의 아미노산을 포함하는 적어도 하나의 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0016] 적어도 하나의 항체는 친화성(적어도 10^{-9} M, 바람직하게는 적어도 10^{-10} M의 K_D)으로 CD22에 임의로 추가로 결합할 수 있고/있거나 적어도 하나의 CD22 단백질의 적어도 하나의 활성을 실질적으로 중화할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항체는 적어도 5×10^{-10} M, 바람직하게는 5×10^{-11} , 보다 바람직하게는 5×10^{-12} 의 친화성 (K_{Ds})을 지닌 CD22에 결합하며 사람 CD22를 중화한다.

[0017] 하나의 국면에서, 본 발명은 적어도 하나의 명시된 서열, 이의 도메인, 부위 또는 변이체를 포함하는, 전술한 특이적인 항-CD22 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나, 이에 대해 상보성이거나, 하이브리드화하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 항-CD22 항체 핵산 분자를 포함하는 재조합체 벡터, 이러한 핵산 및/또는 재조합체 벡터를 함유하는 수주 세포, 및 또한 이러한 항체 핵산, 벡터 및/또는 수주 세포를 제조하고/하거나 사용하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-CD22 항체를 암호화하는 분리된 핵산; 당해 분리된 핵산을 포함하는 분리된 핵산 벡터 및/또는 이러한 분리된 핵산을 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 포함한다. 숙주 세포는 임의로 COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, 흑색종, 또는 림프종 세포, 또는 이의 특정 유도체, 무한증식되거나 형질전환된 세포 중에서 선택된 적어도 하나일 수 있다. 또한 시험판내, 생체내 또는 반응계내에서 조건하에 핵산을 암호화하는 핵산을 해독시킴으로써, CD22 항체가 검출가능하거나 회복가능한 양으로 발현되도록 함을 포함하여, 적어도 하나의 항-CD22 항체를 생산하는 방법이 제공된다.

[0018] 본 발명은 또한, 적어도 하나의 항-CD22 항체가 검출가능하고/하거나 회복가능한 양으로 발현되는 조건하에서 본원에 기술된 바와 같은 수주 세포를 배양함을 포함하여, 수주 세포내에서 적어도 하나의 전술한 항-CD22 항체를 발현시키는 적어도 하나의 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 (a) 본원에 기술된 바와 같은 핵산 및/또는 항체를 암호화하는 분리된 항-CD22 항체; 및 (b) 적합한 담체 또는 희석제를 포함하는 적어도 하나의 조성물을 제공한다. 담체 또는 희석제는 공지된 담체 또는 희석제에 따라서, 임의로 약제학적으로 허용가능할 수 있다. 당해 조성물은 적어도 하나의 추가의 화합물, 단백질 또는 조성물을 임의로 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 당해 분야에 공지되고/되거나 본원에 기술된 바와 같은, 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자내에서 및/또는 관련된 상태 전에, 후속적으로, 또는 동안에 적어도 하나의 CD22 관련된 상태를 조절하거나 치료하기 위한 치료학적으로 효과적인 양을 투여하기 위한 적어도 하나의 항-CD22 항체 방법 또는 조성물을 추가로 제공한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 분리된 항-CD22 항체의 유효량을 포함하는 조성물을 세포, 조직, 기관 또는 동물과 접촉시키거나 이에 투여함을 포함하여, 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 CD22 관련된 상태를 진단하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다. 당해 방법은 유효량의 0.001 내지 50mg/kg의 본 발명의 항-CD22 항체를 세포, 조직, 기관 또는 동물에게 사용함을 임의로 추가로 포함할 수 있다. 당해 방법은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복부내, 관절내(intracapsular), 연골내, 강내, 복내, 뇌내, 뇌실내, 결장내, 자궁내, 위장내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심막내, 복강내, 늑막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 자궁내, 소낭내, 덩어리로(bolus), 질내, 직장, 볼내, 설하, 비강내, 또는 경피 중에서 선택된 하나 이상의 방식으로 접촉시키거나 투여함을 임의로 추가로 포함할 수 있다. 당해 방법은, 검출가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항체, 항류마티스제, 근육 이완제, 마약, 비-스테로이드성 소염 약물 (NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근-r 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화작용 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사약물, 항우울제, 항정신병제, 자극인자, 천식 의약, 베타 효능제, 흡입된 스테로이드, 에피네프린 또는 이의 유사체, 세포독성 또는 다른 항암제, 메토트렉세이트와 같은 항-대사산물, 중식 억제제, 사이토킨, 사이토킨 길항제, 및 항-TNF α 또는 다른 모노클로날 항체 또는 이기능성 항체 중의 적어도 하나로부터 선택된 적어도 하나의 화합물 또는 단백질의 유효량을 포함하는 적어도 하나의 조성물을 항체와 접촉시키기 전에, 동시에, 또는 후에 투여함을 임의로 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자내에서 및/또는 당해 분야에 공지되고/되거나 본원에 기술된

관련된 상태 전에, 후속적으로, 또는 동안에 적어도 하나의 CD22 관련된 상태를 진단하기 위한 적어도 하나의 항-CD22 항체 방법을 추가로 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 적어도 하나의 항-CD22 항체를 진단하기 위한 적어도 하나의 조성물, 장치 및/또는 전달 방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명의 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-CD22 항체를 포함하는 의학 장치를 제공하며, 여기서 당해 장치는 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복부내, 관절내, 연골내, 강내, 복내, 뇌내, 뇌실내, 소뇌내, 결장내, 자궁경부내, 위장내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심막내, 복강내, 늑막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 소낭내, 덩어리로, 질내, 직장, 볼내, 설하, 비강내, 또는 경피 중에서 선택된 하나 이상의 방식으로 적어도 하나의 항-CD22 항체를 접촉시키거나 투여하기에 적합하다.

[0024] 추가의 국면에서, 본 기재내용은 제1의 용기로부터 동결건조된 형태의 본 기재내용의 적어도 하나의 항-CD22 항체 또는 단편, 및 멸균수, 멸균 완충수, 또는 수성 희석제 속의 폐놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 폐닐머큐리 니트라이트, 폐녹시에탄올, 포름알데하이드, 클로로부탄올, 염화마그네슘, 알킬 파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이의 혼합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 방부제를 포함하는 임의의 제2의 용기를 포함하는 키트(kit)를 제공한다. 하나의 국면에서, 키트 속에서, 제1의 용기 속의 항-CD22 항체 또는 규정된 부위 또는 변이체의 농도는 제2 용기의 함량과 함께 약 0.1 mg/ml 내지 약 500 mg/ml의 농도로 재구성된다. 다른 국면에서, 제2의 용기는 등장성 제제를 추가로 포함한다. 다른 국면에서, 제2의 용기는 생리학적으로 허용되는 완충제를 추가로 포함한다. 하나의 국면에서, 본 기재내용은 이를 필요로 하는 환자에게 키트 속에 제공되고 투여 전에 재구성된 제형을 투여함을 포함하여, 적어도 하나의 항-CD22 매개된 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명의 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-CD22 항체의 용액 또는 동결건조된 형태를 포함하는 용기 및 포장된 물질을 포함하는, 사람 약제 또는 진단용 제조 제품이 제공된다. 당해 제조 제품은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복부내, 관절내, 연골내, 강내, 복내, 뇌내, 소뇌내, 결장내, 자궁경부내, 위장내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심막내, 복강내, 늑막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 소낭내, 덩어리로, 질내, 직장, 볼내, 설하, 비강내, 또는 경피 전달 장치 또는 시스템의 부품으로서 용기를 가짐을 임의로 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명은 본원에 기술된 어떠한 발명도 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 VM1000의 경쇄(서열 번호 1, 17) 및 중쇄(서열 번호 33, 49) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열을 각각 나타낸다.

도 2는 VM1001의 경쇄(서열 번호 2, 18) 및 중쇄(서열 번호 34, 50) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 3은 VM1002의 경쇄(서열 번호 3, 19) 및 중쇄(서열 번호 35, 51) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 4는 VM1003의 경쇄(서열 번호 4, 20) 및 중쇄(서열 번호 36, 52) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 5는 VM1004의 경쇄(서열 번호 5, 21) 및 중쇄(서열 번호 37, 53) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 6은 VM1005의 경쇄(서열 번호 6, 22) 및 중쇄(서열 번호 38, 54) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 7은 VM1006의 경쇄(서열 번호 7, 23) 및 중쇄(서열 번호 39, 55) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 8은 VM1007의 경쇄(서열 번호 8, 24) 및 중쇄(서열 번호 40, 56) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 9는 항-CD22 Ab VM1008의 경쇄(서열 번호 9, 25) 및 중쇄(서열 번호 41, 57) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 10은 VM1009의 경쇄(서열 번호 10, 26) 및 중쇄(서열 번호 42, 58) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 11은 VM1010의 경쇄(서열 번호 11, 27) 및 중쇄(서열 번호 43, 59) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 12는 VM1011의 경쇄(서열 번호 12, 28) 및 중쇄(서열 번호 44, 60) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 13은 VM1012의 경쇄(서열 번호 13, 29) 및 중쇄(서열 번호 45, 61) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 14는 VM1013의 경쇄(서열 번호 14, 30) 및 중쇄(서열 번호 46, 62) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 15는 VM1014의 경쇄(서열 번호 15, 31) 및 중쇄(서열 번호 47, 63) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 16은 VM1015의 경쇄(서열 번호 16, 32) 및 중쇄(서열 번호 48, 64) 가변 영역에 대한 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 17은 본 발명의 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015의 선택된 클론의 친화성 ELISA 분석용 데이터를 나타낸다.

도 18은 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015의 재조합체 CD22 세포와 도메인 및 대조군(VM006G 및 VM006H)에 대한 친화성 상수(KD)의 표면 플라스몬 공명(SPR) 측정을 위한 데이터를 나타낸다.

도 19는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015로부터의 선택된 클론 및 또한 대조군의 형광성 활성화된 세포 분류(FACS)에 의한 Daudi, RAMOS 및 RAJI B 세포주와 같은 CD22를 발현하는 사람 림프종 세포에서 표면 결합 및 내부화 분석을 위한 데이터를 나타낸다. 각각의 박스내 우측 상의 모든 피크는 대조군(항체 없음)을 나타내고; 각각의 박스내 좌측 상의 모든 피크는 항체를 사용한 데이터를 나타내므로, 이에 의해 보다 낮은 형광성 시그널로의 이동은 수용체/항체 내부화를 나타낸다. 박스 1은 양성 대조군 항체를 나타내고, 박스 2는 VM1000을 나타내며, 박스 3은 VM1001을 나타내고, 박스 4는 VM1002를 나타내며, 박스 5는 VM1004를 나타내고, 박스 6은 VM1005를 나타내며, 박스 7은 VM1006을 나타내고, 박스 8은 VM1011을 나타낸다.

도 20은 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015 및 대조군(BA006G)의 FACS를 사용한 표면 결합 및 내부화 분석으로부터의 데이터를 지닌 표를 나타낸다.

도 21은 본 발명의 항체 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015의 정량적 공총점 면역형광 현미경을 사용한 신속한 표면 결합 및 세포내 내부화에 대한 데이터를 나타낸다.

도 22a 및 도 22b는 본 발명의 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015로부터의 선택된 항체에 대한 노출 시 사람 림프종 세포주 Daudi의 표면에 존재하는 CD22의 CD22 타이로신 인산화의 유도를 나타낸다.

도 23은 영장류 종, 시노몰구스 마카크(cynomologus macaques)[마카카 파스키큘라리스(Macaca fascicularis)]의 세포 상에 발현된 CD22에 대한 항-CD22 항체의 교차 반응성을 입증하는 데이터를 나타낸다. 각각이 시험 조건을 위해 세포를 PBS 속에 세척한 후, PBS 속에서 4% 포름알데하이드로 10분 동안 실온에서 고정시켰다. 이후에, 세포를 2% FBS를 함유하는 0.5 ml의 PBS 속에 재현탁시킨 후 형광성 활성화된 세포 분류(FACS) 분석(1)에 의해 CD22 및 CD20 표면 염색에 대해 분석하였다. 항체로 처리하지 않은 세포는 FITC 또는 PE 채널(1A)에서 형광성 강도의 주목할만한 이동을 가지지 않았지만, VM101-PE로 염색된 세포는 CD22 양성 집단(1B)를 함유하였다.

유사하게, 항-CD20-FIT로 염색된 세포는 CD20 양성 집단(1C)을 함유하였다. VM101-PE 및 CD20-FITC 항체 둘 다로 염색된 세포는 PBMC의(1D)에서 항원들 둘 다의 발현 패턴을 기준으로 하는 것을 제외할 수 있으므로 이중 표지된 집단을 갖는다. VM101은 시노몰구스 CD22 단백질을 특이적으로 인식한다.

도 24는 본 발명의 항-CD22 항체의 포유동물 세포내 고 수준의 발현 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

인용

본원에 인용된 모든 공보 또는 특허는, 이들이 본 발명의 시기에 당해 분야의 상태를 나타내므로 참조로 본원에 전체적으로 혼입되고/되거나 본 발명의 설명 및 가능성을 제공한다. 공보는 어떠한 과학 또는 특허 공보, 또는 모든 기록된, 전자 또는 인쇄 양식을 포함하는 어떠한 매체 양식으로 이용가능한 어떠한 다른 정보를 말한다. 다음의 참조는 참조로 본원에 전체적으로 혼입된다: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y.(1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.sup.nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY(1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y.,(1997-2001).

아미노산 코드

본 발명의 항-CD22 항체를 제조하는 아미노산은 흔히 약술된다. 아미노산 명칭은 당해 분야에 잘 이해되는 것으로서 아미노산을 이의 단일 문자 코드, 이의 3문자 코드, 명칭 또는 3개의 뉴클레오타이드 코돈(들)에 의해 아미노산을 지정함으로써 나타낼 수 있다(참조: Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

정의

본원에 사용된 것으로서, "항-CD22 항체", "항-CD22 항체", "항-CD22 항체 부위", 또는 "항-CD22 항체 단편" 및/또는 "항-CD22 항체 변이체" 등은, 본원의 항체내로 혼입될 수 있는, 비-취 기원, 바람직하게는 사람 기원의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 고정 영역, 골격 영역, 또는 이의 어떠한 일부분과 함께, VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 중의 적어도 하나로부터 기원한 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간드 결합 부위의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 특정 단백질 또는 펩타이드를 포함한다. 달리는, 용어 "항-CD22 항체"는 사람화된 모노클로날 항체 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015를 총칭적으로 또는 개별적으로 말할 것이다. 이러한 항체는 적어도 하나의 CD22 활성 또는, 시험관내, 반응계내 및/또는 생체내에서 CD22 수용체 활성 또는 결합을 조절하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 길항하고/하거나, 경감하고/하거나, 완화시키고/시키거나, 차단하거나, 억제하고/하거나, 폐지하고/하거나 방해할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 본 발명의 적합한 항-CD22 항체, 규정된 부위 또는 변이체는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 모노클로날 항체중의 적어도 하나에 의해 인식된 사람 CD22의 억제 및/또는 중화 에피토프에 대해 고 친화성으로 결합할 수 있다. 적합한 항-CD22 항체, 규정된 부위, 또는 변이체는 또한 RNA, DNA 또는 단백질 합성, CD22 방출, CD22 수용체 시그널링, 막 CD22 분해, CD22 활성, CD22 생산 및/또는 합성과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 CD22 활성 또는 기능 중의 적어도 하나에 임의로 영향을 미칠 수 있다.

용어 "항체"는 항-CD22로부터 기원한 적어도 하나의 CDR를 각각 함유하는, 일본쇄 항체 및 이의 단편을 포함하는, 항체 또는 이의 규정된 단편 또는 부위의 구조 및/또는 기능을 모사하는 항체의 부위를 포함하거나 항체 모사체를 포함하는, 항체, 분해 단편, 이의 규정된 부위 및 변이체를 포함하는 것으로 추가로 의도된다. 기능성 단편은 포유동물 CD22에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, Fab(예를 들면, 파파인 분해), Fab'(예를 들면, 펩신 분해 및 부분적인 환원에 의함) 및 F(ab')₂(예를 들면, 펩신 분해), facb(예를 들면, 플라스민 분해), pFc'(예를 들면, 펩신 또는 플라스민 분해에 의함), Fd(예를 들면, 펩신 분해, 부분적 환원 및 재응집에 의함), Fv 또는 scFv(예를 들면, 분자 생물학 기술에 의함) 단편을 포함하나, 이에 한정되지 않는

CD22에 결합할 수 있는 항체 단편 또는 이의 부위가 본 발명에 포함된다(참조: 예를 들면, Colligan, Immunology, 상기 참조).

[0035] 항체 단편은 당해 분야에 공지되고/되거나 본원에 기술된 바와 같이, 효소적 분해, 합성 또는 재조합체 기술에 의해 생산될 수 있다. 항체는 또한, 하나 이상의 정지 코돈이 천연의 정지 부위의 상부에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 트렁케이트된 형태(truncated form)로 생산될 수 있다. 예를 들어, $F(ab')_2$ 중쇄 부위를 암호화하는 조합 유전자를 설계하여 중쇄의 CH_1 도메인 및/또는 헌지 영역(hinge region)을 암호화하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 항체의 각종 부위는 통상의 기술에 의해 화학적으로 함께 연결되거나, 유전 가공 기술을 사용하여 연속된 단백질로서 제조할 수 있다.

[0036] 본원에 사용된 것으로서, "키메라" 항체 또는 "사람화된" 항체 또는 "CDR-이식된"은 비-쥐, 바람직하게는 사람 항체로부터 기원한 하나 이상의 단백질 또는 웨პ타이드와 결합된 본원에 기술된 항-CD22 Ab, 또는 어떠한 CDR의 특정 조합을 포함한다. 본 발명에 따라서, 키메라 또는 사람화된 항체는, CDR이 본원에 기술된 항-CD22 Ab 및 적어도 하나의 부위 중의 하나 이상으로부터 기원하거나, 항체의 나머지가 하나 이상의 사람 항체로부터 기원한 것들을 포함한다. 따라서, 항체의 사람 부분은 사람에서 실질적으로 비-면역원성인 골격, C_L , C_H 도메인(예를 들면, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), 헌지, (V_L , V_H) 영역을 포함할 수 있다. 사람 항체로부터 기원한 항체의 영역은 사람 항체와 100% 동일할 필요가 없다. 바람직한 구현예에서, 가능한 많은 사람 아미노산 잔기가 무시할 수 있게 되는 면역원성을 위해 순서대로 유지되지만, 사람 잔기는 CDR에 의해 형성된 항원 결합 부위를 지지하는데 필수적인 것으로 변형될 수 있는 반면 항체의 사람화를 동시에 최대화시킬 수 있다. 이러한 변화 또는 변이는 변형되지 않은 항체에 대해 사람 또는 다른 종에서 면역원성을 임의로 및 바람직하게는 보유하거나 감소시킨다. 사람화된 항체가 기능적으로 재배열된 사람 면역글로불린(예를 들면, 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 비-사람 동물 또는 원핵 또는 진핵 세포에 의해 생산될 수 있음이 지적된다. 또한, 항체가 일본쇄 항체인 경우, 이는 천연의 사람 항체에서 발견되지 않은 링커 웨პ타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fv는, 중쇄의 가변 영역 및 경쇄의 가변 영역을 연결하는, 다른 아미노산 잔기 또는 2개 내지 약 8개의 글리신과 같은 링커 웨პ타이드를 포함할 수 있다. 이러한 링커 웨პ타이드는 사람 기원인 것으로 고려된다.

[0037] 항체 사람화는 예를 들면, 개개의 사람 골격의 혼주물(pool)에 프레임내(in frame)로 융합된 비-사람 표적 모노클로날 항체의 6개의 CDR을 포함하는 조합 라이브리리를 합성함으로써 수행할 수 있다. 공지된 중쇄 및 경쇄 사람 배선 유전자 모두를 대표하는 유전자를 함유하는 사람 골격 라이브리리를 이용할 수 있다. 이후에, 수득되는 조합 라이브리리는 목적한 항원에 대한 결합을 위해 스크리닝될 수 있다. 당해 시도는 모 항체에 대한 결합 활성을 유지하는 측면에서 완전한 사람 골격의 가장 양호한 조합의 선택을 위해 허용될 수 있다. 이후에, 사람화된 항체는 다양한 기술에 의해 추가로 최적화될 수 있다.

[0038] 완전한 길이의 항체 분자의 경우, 면역글로불린 유전자는 하이브리도마 세포주의 게놈 DNA 또는 mRNA로부터 수득될 수 있다. 항체 중쇄 및 경쇄는 포유동물 벡터 시스템 속에서 클로닝된다. 조립은 이본쇄 서열 분석으로 문서화된다. 항체 작제물은 다른 사람 또는 포유동물 숙주 세포주내에서 발현될 수 있다. 이후에, 작제물은 목적한 발현된 항체의 일시적인 형질감염 분석 및 웨스턴 블로트 분석에 의해 입증될 수 있다. 생산성이 최고인 안정한 세포주를 분리하여 신속한 검정 방법을 사용하여 스크리닝할 수 있다.

[0039] 수개의 공보가 본 발명의 항-CD22 항체를 포함하는 항-CD22 항체의 사용, 적용 및 사용과 적용 방법을 상세히 기술하고 있다(예를 들면, 이들 모두가 본원에 참조로 혼입된 "Humanized Anti-CD22 antibodies and Their Use"라는 명칭의 미국 특허원 US20110182887, "Human Monoclonal Antibodies Specific for CD22"라는 명칭의 미국 특허원 US20110020344, 및 "Human Antibodies That Bind CD22 and Uses Thereof"라는 명칭의 미국 특허원 US20100143368).

본 발명의 항체

[0040] 본 발명에 따라서, 항-CD22 항체는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 항체 중의 어느 하나, 또는 가변 영역 또는 CDR이 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 항체 중의 어느 하나로부터 기원하고 항체의 골격 및 고정 영역이 하나 이상의 사람 항체로부터 기원한 항체를 포함한다. 항체로부터 기원한 가변 영역 또는 CDR은, 치환, 삽입 및 결실을 포함하는 어떠한 및 모든 변형이, 키메라 항체가 CD22에 결합하여 이를 억제하는 능력을 유지하는 한 고려된다고 해도, 바람직하게는 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008,

VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 항체 중의 어느 하나의 가변 영역 또는 CDR과 약 90% 내지 약 100% 동질성(identity)을 갖는다. 사람 항체로부터 기원한 키메라, 사람화되거나 CDR-이식된 항체의 영역은 사람 항체와 100% 동질성일 필요가 없다. 바람직한 구현예에서, 가능한 많은 사람 아미노산이, 면역원성이 무시될 정도로 유지되지만, 사람 잔기, 특히 골격 영역의 잔기는 본 발명에 따라서 하기 본원에 교시된 바와 같이 및 요구되는 바와 같이 치환된다. 본원에 기재된 것으로서 이러한 변형은 CDR에 의해 형성된 항원 결합 부위를 지지하면서 항체의 사람화를 동시에 최대화하는데 필수적이다.

[0042] 본 발명에 따라서, 항-CD22 항체의 가변 영역(경쇄 및 중쇄)의 핵산 서열 및 유추된 아미노산 서열은 도 1 내지 15에 설정되어 있다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 각각은 항원 결합 부위를 형성하기 위해 조합되는 3개의 CDR을 함유한다. 3개의 CDR은 CDR를 지지하기 위해 주로 기능하는 4개의 골격 영역에 의해 둘러싸여 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 서열내 CDR의 서열은 문헌[참조: Kabat et al.(1987) in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., United States Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.)에 따른 컴퓨터-보조된 정렬에 의해, 또는 예를 들면, 문헌[참조: ENCAD program as described by Levitt(1983) J. Mol. Biol. 168:595]에 기술된 바와 같은 ENCAD 프로그램을 사용하는 가변 영역의 문자 모델링에 의해 확인할 수 있다.

[0043] 바람직한 구현예에서, CDR은 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 중의 어느 하나로부터 기원한다. 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR의 측정은 당해 분야의 숙련가의 기술내에 있다(참조: 예를 들면, <http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

[0044] 항-CD22 항체의 CDR의 서열은, CDR-이식된 항체가 사람 CD22에 결합하여 이를 억제하는 능력을 유지하는 정도로 삽입, 치환 및 결실에 의해 변형될 수 있다. 통상의 기술자는 하기 본원에 기술된 기능적 검정을 수행함으로서 당해 활성의 유지를 확인할 수 있다.

[0045] 대안적으로, VM 1000, VM 1001, VM 1002, VM 1003, VM 1004, VM 1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 중의 어느 하나의 전체 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 사람 고정 및 골격 영역과 결합되어 본 발명의 키메라 항체를 형성할 수 있다. 물론 VM1000은 경쇄 VM1000LC(서열 번호 1) 및 중쇄 VM1000HC(서열 번호 33)를 포함한다. 물론 VM1001은 경쇄 VM1001LC(서열 번호 2) 및 중쇄 VM1001HC(서열 번호 34)를 포함한다. 물론 VM1002는 경쇄 VM1002LC(서열 번호 3) 및 중쇄 VM1002HC(서열 번호 35)를 포함한다. 물론 VM1003은 경쇄 VM1003LC(서열 번호 4) 및 중쇄 VM1003HC(서열 번호 36)을 포함한다. 물론 VM1004는 경쇄 VM1004LC(서열 번호 5) 및 중쇄 VM1004HC(서열 번호 37)을 포함한다. 물론 VM1005는 경쇄 VM1005LC(서열 번호 6) 및 중쇄 VM1005HC(서열 번호 38)를 포함한다. 물론 VM1006은 경쇄 VM1006LC(서열 번호 7) 및 중쇄 VM1006HC(서열 번호 39)를 포함한다. 물론 VM1007은 경쇄 VM1007LC(서열 번호 8) 및 중쇄 VM1007HC(서열 번호 40)을 포함한다. 물론 VM1008은 경쇄 VM1008LC(서열 번호 9) 및 중쇄 VM1008HC(서열 번호 41)을 포함한다. 물론 VM1009는 경쇄 VM1009LC(서열 번호 10) 및 중쇄 VM1009HC(서열 번호 42)을 포함한다. 물론 VM1010은 경쇄 VM1010LC(서열 번호 11) 및 중쇄 VM1010HC(서열 번호 43)을 포함한다. 물론 VM1011은 경쇄 VM1011LC(서열 번호 12) 및 중쇄 VM1011HC(서열 번호 44)을 포함한다. 물론 VM1012는 경쇄 VM1012LC(서열 번호 13) 및 중쇄 VM1012HC(서열 번호 45)을 포함한다. 물론 VM1013은 경쇄 VM1013LC(서열 번호 14) 및 중쇄 VM1013HC(서열 번호 46)을 포함한다. 물론 VM1014는 경쇄 VM1014LC(서열 번호 15) 및 중쇄 VM1014HC(서열 번호 47)을 포함한다. 물론 VM1015는 경쇄 VM1015LC(서열 번호 16) 및 중쇄 VM1015HC(서열 번호 48)을 포함한다.

[0046] 본 발명의 사람화된 항체, 단편 및 영역의 고정(C) 영역을 암호화하는 사람 유전자는 사람 태아 간 라이브러리로부터 공지된 방법에 의해 기원할 수 있다. 사람 C 영역 유전자는 사람 면역글로불린을 발현하고 생산하는 것들을 포함하는 어떠한 사람 세포로부터도 기원할 수 있다. 사람 C_H 영역은 이의 γ, μ, α, δ, ε, 및 이의 아형을 포함하는 G1, G2, G3 및 G4와 같은 사람 H 쇄의 공지된 부류 또는 아형 중의 어느 것으로부터 기원할 수 있다. H 쇄 동형은 항체의 다양한 효과기 기능에 관여하므로, C_H 영역의 선택은 상보체 고정, 또는 항체-의존 성 세포 세포독성(ADCC)에서의 활성과 같은 바람직한 효과기 기능에 의해 안내될 것이다. 바람직하게는, C_H 영역은 감마 1(IgG1)으로부터 기원한다.

[0047] 사람 C_L 영역은 사람 L 쇄 동형, 카파 또는 람다, 바람직하게는 카파로부터 기원할 수 있다.

[0048] 사람 면역글로불린 C 영역을 암호화하는 유전자는 표준 클로닝 기술[예를 들면, Sambrook, et al.(Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989) and Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology(1987-1993)]에 의해 사람 세포로부터 수득된다. 사람 C 영역 유전자는 2개 부류의 L 쇄, 5개 부류의 H 쇄 및 이의 소부류를 나타내는 유전자를 함유하는 공지된 클론으로부터 용이하게 이용가능하다. $F(ab^1)_2$ 및 Fab와 같은, 키메라 항체 단편은 적절하게 트렁케이트된 키메라 H 쇄 유전자를 설계함으로써 제조할 수 있다. 예를 들면, $F(ab^1)_2$ 단편의 H 쇄 부위를 암호화하는 키메라 유전자는 CH1 도메인 및 H 쇄의 힌지 영역을 암호화하고, 이후 해독 정지 코돈을 암호화하는 DNA 서열을 포함함으로써 트렁케이트된 분자를 수득할 수 있다.

[0049] 일반적으로, 하나의 예에서, 본 발명의 사람화된 항체, 단편 및 영역은 항 CD22 특이적인 항체의 H 및 L 쇄 항 원-결합 영역을 암호화하는 DNA 분절을 클로닝하고, 이를 DNA 분절을 C_H 및 C_L 영역을 각각 포함하는 DNA 분절에 결합시킴으로써 완전한 길이의 면역글로불린을 암호화하는 유전자를 생산한다.

[0050] 항체의 다양한 영역의 서열은, 키메라 항체가 사람 CD22에 결합하여 이를 억제하는 능력을 유지하는 정도로 삽입, 치환 및 결실에 의해 변형될 수 있다. 통상의 기술자는 본원의 하기에 기술된 기능성 검정을 수행함으로써 당해 활성의 유지를 확인할 수 있다. 가변 영역은 예를 들면, 서열 번호 1 내지 64의 가변 영역에 대해 약 50% 내지 약 100% 상동성을 가질 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항체의 가변 영역은 서열 번호 1 내지 64의 가변 영역에 대해 약 80% 내지 약 100% 상동성을 가진다. 보다 바람직한 구현예에서, 가변 영역은 서열 번호 1 내지 64의 가변 영역에 대해 약 90% 내지 약 100% 상동성을 가진다.

[0051] 하나의 구체적인 국면에서, 기재내용의 바람직한 항-CD22 Mab는 서열 번호 17 내지 32에 대해 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 상동성을 가진 가변 경쇄 영역을 포함하며 서열 번호 49 내지 64에 대해 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 상동성을 가진 가변 중쇄 영역을 추가로 포함한다.

[0052] 하나의 구체적인 국면에서, 본 기재내용의 바람직한 항-CD22 Mab는 서열 번호 1 내지 16 중의 하나로부터 선택된 가변 경쇄 영역을 포함한다. 다른 구체적인 국면에서, 본 기재내용의 바람직한 항-CD22 Mab는 서열 번호 33 내지 48 중의 하나로부터 선택된 가변 중쇄 영역을 포함한다.

[0053] 비-사람 또는 사람 항체를 가공하거나 사람화하는 방법이 사용될 수 있으며 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 일반적으로, 사람화되거나 가공된 항체는 비-사람, 예를 들면 마우스, 랫트, 토끼, 비-사람 영장류 또는 다른 포유동물이나, 이에 한정되지 않는 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이를 아미노산 잔기는 흔히 "수입(import)" 잔기로 언급되며, 이는 전형적으로 공지된 사람 서열의 "수입" 가변성, 고정 또는 다른 도메인으로부터 취한다. 공지된 사람 Ig 서열은 예를 들면, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;

[0054] www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/;

[0055] www.Antibodyresource.com/onlinecomp.html;

[0056] www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;

[0057] www.hhmi.org/grants/lectures/1996/v1ab/;

[0058] www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.Antibodyresource.com/;

[0059] mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/;

[0060] pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/;

[0061] www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;

[0062] www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;

[0063] www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html;

[0064] www.isac-net.org/sites_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.de/.aboutrek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;

- [0065] www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; [imgt.cnusc.fr: 8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/);
- [0066] www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
- [0067] abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
- [0068] www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;
- [0069] www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
- [0070] www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;
- [0071] www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
- [0072] www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
- [0073] www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept_spottech.html;
- [0074] www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.coVibm.html. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health(1983)에 기재되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 혼입된다.
- [0075] 이러한 수입된 서열을 사용하여 면역원성을 감소시키거나, 당해 분야에 공지된 것으로서, 결합, 친화성, 온-속도(on-rate), 오프-속도(off-rate), 항원항체결합력, 특이성, 반감기, 또는 어떠한 다른 적합한 특성을 감소시키거나, 향상시키거나 변형시킬 수 있다. 일반적으로 비-사람 또는 사람 CDR 서열 중의 일부 또는 모두는 유지되지만, 가변 및 고정 영역의 비-사람 서열은 사람 또는 다른 아미노산으로 대체된다. 항체는 또한 항원에 대해 고 친화성 및 다른 양호한 생물학적 특성의 보유와 함께 임의로 사람화될 수 있다. 당해 목표를 달성하기 위하여, 사람화된 항체는 모 및 사람화된 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 각종의 구상된 사람화된 생성물의 분석 공정으로 임의로 제조할 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델이 일반적으로 이용가능하며 당해 분야의 숙련가에게 친숙하다. 선택된 후보물 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태적 구조를 나열하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이의 점검은 후보물 면역글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기의 유사한 역할의 분석, 즉, 이의 항원에 결합하는 후보물 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 컨센서스(consensus) 및 수입 서열로부터 선택되어 결합됨으로써 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 바람직한 항체 특성이 달성될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로 및 가장 실질적으로 관여된다. 본 발명의 항체의 사람화 또는 가공은, 각각이 본원에 참조로 전체적으로 혼입되고, 이에 인용된 참조문헌을 포함한, Winter(Jones et al., Nature 321 :522(1986); Riechmann et al., Nature 332:323(1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534(1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296(1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901(1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285(1992); Presta et al., J. Immunol. 151 :2623(1993), 미국 특허 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246에 기술된 것들과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 어떠한 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 사람화된 항체의 사람 고정 영역은 어떠한 부류(IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 등) 또는 동형일 수 있으며 카파 또는 람다 경쇄를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 사람 고정 영역은 IgG 중쇄 또는 정의된 단편, 예를 들면, 동형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중의 적어도 하나를 포함한다. 다른 구현예에서, 항-사람 CD22 사람 항체는 IgG1 중쇄 및 IgG1 K 경쇄를 포함한다. 본 발명은 분리된 항-CD22 항체는 어떠한 적합한 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 본원에 기재된 항체 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항체 또는 항원-결합 단편은 사람 CD22에 결합함으로써, 단백질의 적어도 하나의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 실질적으로 중화시킨다. 항체, 또는 이의 규정된 일부 또는 변이체는 적어도 하나의 CD22 단백질 또는 단편의 적어도 하나의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 바람직하게는 실질적으로 중화시킴으로써 CD22의 CD22 수용체에 대한 결합을 통하거나 다른CD22-의존적 또는 매개된 메카니즘을 통해 매개된 활성을 억제한다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "중화 항체"는 CD22-의존적 활성을 검정에 따라 약 20 내지 120%, 바람직하게는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 이상까지 억제할 수 있는 항체를 말한다. CD22-의존적 활성을 억제하는 항-CD22 항체의 능력은 본원에 기술되고/되거나 당해 분야에 공지된 바와 같이, 적어도 하나의 적합한 CD22 단백질 또는 수용체 검정에 의해 평가된다.

[0077]

본 발명의 적어도 하나의 항체는 적어도 하나의 CD22 단백질, 소단위, 단편, 이의 부위 또는 어떠한 조합에 대해 특이적인 적어도 하나의 규정된 에피토프에 결합한다. 적어도 하나의 에피토프는 단백질의 적어도 하나의 부위를 포함하는 적어도 하나의 항체 결합 영역을 포함할 수 있으며, 당해 에피토프는 바람직하게는 단백질의 적어도 하나의 세포외, 가용성, 친수성, 외부 또는 세포질 부위를 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 사람 항체 또는 항원-결합 단편은 본원에 기술된 항-CD22 Ab로부터 기원한, 적어도 하나의 사람 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 또는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역의 변이체 및 적어도 하나의 사람 상보성 결정 영역(CDR4, CDR5 및 CDR6) 또는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역의 변이체를 포함하는 항원-결합 영역을 포함할 것이다. 특수 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 상응하는 CDR 1, 2 및/또는 3의 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 중쇄 CDR(즉, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3)의 부위를 적어도 포함하는 항원-결합 영역을 가질 수 있다. 다른 특수 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 부위 또는 변이체는 상응하는 CDR 4, 5 및/또는 6의 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 경쇄 CDR(즉, CDR4, CDR5 및/또는 CDR6)의 적어도 일부를 포함하는 항원-결합 영역을 가질 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편의 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR은 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 또는 VM1015 중의 적어도 하나의 상응하는 CDR의 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 항체는 재조합체 DNA 기술의 통상의 기술을 사용하여 항체를 암호화하는 (즉, 하나 이상의) 핵산 분자를 제조하고 발현하거나 본 발명의 폴리펩타이드의 발현을 생성할 가능한 풍부한 코돈 중의 어느 것을 사용하고 어떠한 다른 접합한 방법을 사용함으로써, 통상의 기술을 사용하여 항체의 다양한 부위(예를 들면, CDR, 골격)과 함께 화학적으로 제조할 수 있다.

[0078]

경쇄 및 중쇄에 대한 조합적 가변 도메인 사람화된 라이브러리의 액상 합성을 사용할 수 있다. 예를 들면, 사람화된 경쇄(LC) 가변 도메인 라이브러리의 조립은 사람 경쇄 골격(FW) 및 비-사람 상보성 결정 영역(CDR)을 함유한다. 라이브러리는 예를 들면, FW 및 CDR DNA 단편의 단계적 액상 연결을 사용함으로써 조립한다. 라이브러리는 당해 분야의 기술자에게 공지된 기술에 의해 FW 및 CDR DNA 단편을 FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3의 순서로 단계별 액상 연결을 사용하여 조립한다. 예를 들면, 다음 참조문헌 중의 하나 이상의 기술을 사용하며, 이들 각각은 본원에 참조로 혼입되어 있다. 문헌: Lo, B.K., 2003, Antibodies humanization by CDR grafting. Antibody Engineering, Methods and protocols. Edit by Benny K. C. Lo, Methods in Molecular Biology, 248, 135-159; Kashmiri et al., 2003, Developing a minimally immunogenic humanized antibody by CDR grafting. Antibody Engineering, Methods and protocols. Edit by Benny K. C. Lo, Methods in Molecular Biology, 248, 361-376; Bassette, P. H., et al., 2003, Construction of Designed Protein Libraries Using Gene Assembly Mutagenesis. Directed Evolution Library Creation, Methods and protocols. Edit. Arnold and Georgiou, Methods in Molecular Biology, 231, 29-37; Chames, P., et al., 2001, Selections on Biotinylated antigens. Antibody Engineering, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, Springer Lab Manual, 149-166; O'Brien S., and Jones, T., 2001, Humanising antibodies by CDR grafting. Antibody Engineering, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, Springer Lab Manual, 567-590.

[0079]

사람 CD22에 결합하고 정의된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 CDR 영역을 포함하는 항체는 파아지 디스플레이 [참조: Katsume, Y., et al., Int J. Mol. Med., 1(5):863-868(1998)]와 같은 적합한 방법 또는 당해 분야에 공지되고/되거나 본원에 기술된 유전자이식 동물을 사용하는 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 항체, 규정된 부위 또는 변이체는 적합한 숙주 세포 속에서 암호화 핵산 또는 이의 일부를 사용하여 발현시킬 수 있다.

[0080]

기술된 바와 같이, 본 발명은 본원에 기술된 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 서열내 아미노산을 포함하는 항체, 항원-결합 단편, 면역글로불린 쇄 및 CDR에 관한 것이다. 이러한 항-CD22 항체는 본원에 규정된 바와 같이, 천연 돌연변이 또는 사람 조작으로부터, 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 항체 또는 항원-결합 단편 및, 이러한 쇄 또는 CDR을 포함하는 항체는 고 친화성(예를 들면, 약 10^{-9} M 이하의 K_D)으로 사람 CD22에 결합할 수 있다. 본원에 기술된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 보존적 아미노산 치환, 및 또한 아미노산 결실 및/또는 삽입을 포함하는 서열을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 화학적 및/또는 물리적 특성(예를 들면, 전하, 구조, 극성, 소수성/친수성)과 유사한 특성을 갖는 제2의 아미노산에 의한 제1의 아미노산의 대체를 말한다. 보존적 치환은 다음 그룹내 다른 아미노산에 의한 하나의 아미노산의 치환을 포함한다: 라이신(K), 아르기닌(R) 및 히스티дин(H); 아스파르테이트(D) 및 글루타메이트(E); 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S), 트레오닌(T), 타이로신(Y), K, R, H, D 및 E; 알라닌(A), 발린(V), 루이신(L), 이소루이신(I), 프롤린(P), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 메티오닌(M), 시스테인(C) 및 클

리신(G); F, W 및 Y; C, S 및 T.

[0081] 물론, 당해 분야의 숙련가가 이를 수 있는 다수의 아미노산 치환은 상술한 것들을 포함하는, 많은 인자들에 의존한다. 일반적으로 말해서, 특정의 제공된 항-CD22 항체, 단편 또는 변이체에 대한 다수의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실은 본원에 규정된 바와 같이 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 예를 들면, 1 내지 30 또는 이의 어떠한 범위 또는 값 이상이 아닐 것이다.

[0082] 기능에 필수적인 본 발명의 항-CD22 항체의 아미노산은 부위-지시된 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닌 돌연변이 유발[예를 들면, Ausubel, *supra*, Chapters 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085(1989)]과 같은, 당해 분야에 공지된 방법에 의해 확인될 수 있다. 후자의 과정은 문자내 모든 잔기에 단일의 알라닌 돌연변이를 도입한다. 이후에, 수득되는 돌연변이체 문자를 적어도 하나의 CD22 중화 활성과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 생물학적 활성에 대해 시험한다. 항체 결합에 중요한 부위는 또한 결정화, 핵 자기 공명 또는 광친화성 표지와 같은 구조적 분석에 의해 확인될 수 있다[참조: Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904(1992) and de Vos, et al., *Science* 255:306-312(1992)].

[0083] 본 발명의 항-CD22 항체는 서열 번호 17 내지 32 및 49 내지 64로부터 기원한 CDR의 적어도 하나의 연속된 아미노산 5개 또는 모두로부터 선택된 적어도 하나의 일부, 서열 또는 조합을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0084] 항-CD22 항체는 서열 번호 17 내지 32 및 49 내지 64 중의 적어도 하나로부터 기원한 CDR의 연속된 아미노산의 70 내지 100% 중 적어도 하나의 폴리펩타이드를 추가로 임의로 포함할 수 있다. 하나의 구체적인 국면에서, 항-CD22 항체는 서열 번호 1 내지 16에 대해 95 내지 99%의 서열 상동성인 폴리펩타이드를 포함한다. 다른 특수 국면에서, 항-CD22 항체는 서열 번호 33 내지 48에 대해 95 내지 99% 서열 상동성인 폴리펩타이드를 포함한다.

[0085] 하나의 구현예에서, 면역글로불린 쇄, 또는 이의 부위(예를 들면, 가변 영역, CDR)의 아미노산은 서열 번호 17 내지 32 또는 49 내지 64 중의 적어도 하나의 아미노산 서열에 대해 약 70 내지 100% 상동성(예를 들면, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 이의 특정 범위 또는 값)을 갖는다. 바람직하게는, 70 내지 100%의 아미노산 동질성(즉, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 이의 어떠한 범위 또는 값)은 당해 분야에 공지된 바와 같이, 적합한 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 측정한다. 하나의 구체적인 국면에서, 항-CD22 항체는 서열 번호 17 내지 32 또는 49 내지 64에 대해 95 내지 99% 서열 상동성인 폴리펩타이드를 포함한다.

[0086] 예시적인 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 서열 번호 1 내지 64에서 제공된다. 본 발명의 항체, 또는 이의 규정된 변이체는 본 발명의 항체로부터의 연속된 아미노산 잔기의 어떠한 수를 포함할 수 있으며, 여기서 이러한 수는 항-CD22 항체내 연속된 잔기의 수의 10 내지 100%로 이루어진 정수의 그룹으로부터 선택된다. 임의로, 연속된 아미노산의 당해 서열은, 길이가 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250개 이상의 아미노산이거나 이의 어떠한 범위 또는 값이다. 또한, 이러한 아서열(subsequence)의 수는 1 내지 20, 예를 들면, 적어도 2, 3, 4, 또는 5로 이루어진 그룹으로부터 선택된 특정 정수일 수 있다.

[0087] 숙련가가 인지할 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 생물학적으로 활성인 항체를 포함한다. 생물학적으로 활성인 항체는, 천연의(비-합성), 내인성 또는 관련되고 공지된 항체의 특이 활성의 적어도 20%, 30%, 또는 40%, 및 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 또는 70%, 및 가장 바람직하게는 적어도 80%, 90%, 또는 95% 내지 100%의 특이 활성을 갖는다. 효소 활성 및 기질 특이성을 검정하는 방법 및 정량화하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있다.

[0088] 다른 국면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은, 사람 항체 및 항원-결합 단편에 관한 것이며, 이는 유기 잔기의 공유결합성 부착에 의해 변형된다. 이러한 변형은 개선된 약력학적 특성(예를 들면, 증가된 생체내 혈청 반감기)을 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 생산할 수 있다. 유기 잔기는 직쇄 또는 측쇄 친수성 중합체 그룹, 지방산 그룹, 또는 지방산 에스테르 그룹일 수 있다. 특수 구현예에서, 친수성 중합체 그룹은, 분자량이 약 800 내지 약 120,000 달톤(Dalton)이고 폴리알칸 글리콜[예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜(PPG)], 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 수 있으며, 지방산 또는 지방산 에스테르 그룹은 약 8 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0089] 본 발명의 변형된 항체 및 항원-결합 단편은 항체에 직접 또는 간접적으로, 공유결합으로 결합된 하나 이상의 유기 문자를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 결합된 각각의 유기 잔기는 독립적으로

친수성 중합체 그룹, 지방산 그룹 또는 지방산 에스테르 그룹일 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "지방산"은 모노-카복실산 및 디-카복실산을 포함한다. 본원에 사용된 용어로서, "친수성 중합체 그룹"은 옥탄에서 보다는 수 중에서 더 가용성인 유기 중합체를 말한다. 예를 들면, 폴리라이신은 옥탄에서보다 수중에서 더 가용성이다. 따라서, 폴리라이신의 공유결합성 부착에 의해 변형된 항체가 본 발명에 포함된다. 본 발명의 항체를 변형시키기에 적합한 친수성 중합체는 직쇄 또는 측쇄일 수 있으며 예를 들면, 폴리알칸 글리콜(예를 들면, PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜(mPEG), PPG 등), 탄수화물(예를 들면, 텍스트란, 셀룰로즈, 올리고사카라이드, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체(예를 들면, 폴리라이신, 폴리아르기닌, 폴리아스파르테이트 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체를 변형시키는 친수성 중합체는, 분자량이 별개의 문자 실체로서 약 800 내지 약 150,000 달톤이다. 예를 들어, PEG₅₀₀₀ 및 PEG_{20,000}(여기서, 첨자는 중합체의 평균 분자량(달톤)이다)를 사용할 수 있다. 친수성 중합체 그룹은 1 내지 약 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르 그룹으로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르 그룹으로 치환되는 친수성 중합체는 적합한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 아미노 그룹을 포함하는 중합체를 지방산 또는 지방산 에스테르의 카복실레이트와 커플링시킬 수 있으며, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카복실레이트(예를 들면, N,N-카보닐 디이니다졸로 활성화됨)는 중합체 상의 하이드록실 그룹에 커플링될 수 있다.

[0090] 본 발명의 항체를 변형시키는데 적합한 지방산 및 지방산 에스테르는 포화될 수 있거나 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본 발명의 항체를 변형시키는데 적합한 지방산은 예를 들면, n-도데카노에이트(C₁₂, 라우레이트), n-테트라데카노에이트(C₁₄, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트(C₁₈, 스테아레이트), n-에이코사노에이트(C₂₀, 아라키데이트), n-도코사노에이트(C₂₂, 베헤네이트), n-트리아콘타노에이트(C₃₀), n-테트라콘타노에이트(C₄₀), 시스-8,9-옥타데카노에이트(C₁₈, 올레에이트), 모든 시스-8,5,8,11,14-에이코사테트라에노에이트(C₂₀, 아라키도네이트), 옥탄디오산, 테트라데칸디오산, 옥타데칸디오산, 도코산디오산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르는 직쇄 또는 측쇄 저급 알킬 그룹을 포함하는 디카복실산의 모노-에스테르를 포함한다. 저급 알킬 그룹은 1 내지 약 12, 바람직하게는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0091] 변형된 사람 항체 및 항원-결합 단편은 하나 이상의 변형제와의 반응에 의한 것과 같은 적합한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "변형제"는 활성화 그룹을 포함하는 적합한 유기 그룹(예를 들면, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 말한다. "활성화 그룹"은 적절한 조건하에서 제2의 화학 그룹과 반응함으로써 변형제와 제2의 화학 그룹 사이에 공유 결합을 형성할 수 있는 화학적 잔기 또는 작용성 그룹이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화 그룹은 토실레이트, 메실레이트, 할로(클로로, 브로모, 플루오로, 요오도), N-하이드록시석신이미딜 에스테르(NHS) 등과 같은 친전자성 그룹을 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성화 그룹은 예를 들면, 말레이미드, 요오도아세틸, 아크릴롤릴, 피리딜 디설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올(TNB-티올) 등을 포함한다. 알데하이드 작용성 그룹은 아민- 또는 하이드라지드-함유 분자에 커플링될 수 있으며, 아지드 그룹은 3가의 인 그룹과 반응하여 포스포르아미데이트 또는 포스포르이미드 연결을 형성할 수 있다. 활성화 그룹을 분자내로 도입하기에 적합한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Hernanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif.(1996)]. 활성화 그룹은 유기 그룹(예를 들면, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에, 또는 링커 잔기, 예를 들면, 2가의 C₁-C₁₂ 그룹을 통해 직접 결합할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 탄소 원자는 산소, 질소 또는 황과 같은 헤テ로원자에 의해 대체될 수 있다. 적합한 링커 잔기는 예를 들면, 테트라에틸렌 글리콜, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- 및 -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH-를 포함한다. 링커 잔기를 포함하는 변형제는 예를 들면, 모노-Boc-알킬디아민(예를 들면, 모노-Boc-에틸렌디아민, 모노-Boc-디아미노헥산)을 지방산과 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(EDC)의 존재하에 반응시켜 유리 아민과 지방산 카복실레이트 사이에 아미드 결합을 형성시킴으로서 생산할 수 있다. Boc 보호 그룹은 생성물로부터 트리플루오로아세트산(TFA)을 사용한 처리에 의해 제거하여 기술된 바와 같은 다른 카복실레이트에 커플링될 수 있는 1급 아민을 노출시킬 수 있거나, 말레산 무수물과 반응시키고 수득되는 생성물을 폐환시켜 지방산의 활성화된 말레이미도 유도체를 생산할 수 있다(참조: 예를 들면, 이의 전체 교시내용이 본원에 참조로 혼입된, Thompson, et al., WO 92/16221)

[0092] 본 발명의 변형된 항체는 사람 항체 또는 항원-결합 단편과 변형제를 반응시켜 생산할 수 있다. 예를 들어, 유기 잔기는 항체에 비-부위 특이적인 방식으로 아민-반응성 변형제, 예를 들면, PEG의 NHS 에스테르를 사용하여 결합시킬 수 있다. 변형된 사람 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항원-결합 단편의 이황화물 결합(예를 들면, 쇄내 이황화물 결합)을 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 이후에, 환원된 항체 또는 항원-결합 단

편을 티올-반응성 변형체와 반응시켜 본 발명의 변형된 항체를 생산할 수 있다. 본 발명의 항체의 특수 부위에 결합된 유기 잔기를 포함하는 변형된 사람 항체 및 항원-결합 단편은 역 단백질분해[참조: Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3: 147-153(1992); Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417(1994); Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241(1997); Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1): 59-68(1996); Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463(1997)]와 같은 적합한 방법, 및 문헌[참조: Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif.(1996)]에 기술된 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

[0093] 본 발명의 항체는 광범위한 친화성(K_D)을 갖는 사람 CD22에 결합할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 적어도 하나의 사람 mAb는 사람 CD22에 고 친화성으로 임의로 결합할 수 있다. 예를 들면, mAb는 사람 CD22에 약 10^{-7} M 이하, 예를 들면, 0.1 내지 9.9(또는 이의 특정 범위 또는 값) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} 또는 이의 특정 범위 또는 값의 K_D 로 결합할 수 있다.

[0094] 항원에 대한 항체의 친화성 또는 항원항체결합력은 어떠한 적합한 방법[참조: 예를 들면, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y.(1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y.(1992); 및 본원에 기술된 방법]을 사용하여 실험적으로 측정할 수 있다. 특수한 항체-항원 상호작용의 측정된 친화성은, 상이한 조건(예를 들면, 염 농도, pH)하에 측정하는 경우 변할 수 있다. 따라서, 친화성 및 다른 항원-결합 매개변수(예를 들면, K_D , K_a , K_d)의 측정은 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 본원에 기술된 완충제와 같은 표준화된 완충제를 사용하여 수행한다.

[0095] 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 항-CD22 항체는 CD22에 대한 고 친화성 결합 및 임의로 및 바람직하게는 저독성을 가짐을 특징으로 한다. 특히, 본 발명의 항체, 명시된 단편 또는 변이체(여기서, 가변 영역, 고정 영역 및 골격과 같은 개개 성분은 개별적으로 및/또는 총괄적으로, 임의로 및 바람직하게는 저 면역원성을 지닌다)가 본 발명에 유용하다. 본 발명에서 사용될 수 있는 항체는 연장된 기간 동안 증상 및 낫고/낫거나 허용가능한 독성의 측정가능한 완화로 환자를 치료하는 이들의 능력에 의해 임의로 특성화된다. 낫거나 허용가능한 면역원성 및/또는 고 친화성, 및 또한 다른 적합한 특성은 달성된 치료학적 결과에 기여할 수 있다. "낫은 면역원성"은 유의적인 HAHA, HACA 또는 HAMA 반응을 치료된 환자의 약 75% 미만, 또는 바람직하게는 약 50% 미만으로 증가시키고/시키거나 치료된 환자에서 낫은 역가를 증가시키는(이중 항원 효소 면역검정으로 측정된 약 300 미만, 바람직하게는, 약 100 미만) 것으로서 본원에 정의된다[참조: Elliott et al., Lancet 344: 1125-1127(1994), 전체적으로 본원에 참조로 혼입됨].

[0096] 적어도 2개의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날, 사람화된, 항체인 이특이적, 이종특이적, 이종결합체 또는 유사한 항체를 또한 사용할 수 있다. 본 경우에, 결합 특이성 중의 하나는 적어도 하나의 CD22 단백질에 대한 것이며, 다른 것은 어떠한 다른 항원에 대한 것이다. 이특이적 항체를 제조하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 전통적으로, 이특이적 항체의 재조합체 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시-발현을 기본으로 하며, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다[참조: Milstein and Cuello, Nature 305:537(1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위적 분류로 인하여, 이들 하이브리도마(쿼드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산하며, 이중의 단지 하나가 정확한 이특이적 구조를 갖는다. 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 일반적으로 수행되는, 정확한 분자의 정체는 오히려 복잡하고 느리며, 생성물을 수율은 낫다. 유사한 과정이 예를 들면, 문헌[참조: WO 93/08829, 미국 특허 6,210,668, 6,193,967, 6,132,992, 6,106,833, 6,060,285, 6,037,453, 6,010,902, 5,989,530, 5,959,084, 5,959,083, 5,932,448, 5,833,985, 5,821,333, 5,807,706, 5,643,759, 5,601,819, 5,582,996, 5,496,549, 4,676,980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655(1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210(1986)]에 기재되어 있으며, 이를 각각은, 전체가 본원에 참조로 혼입된다.

핵산 분자

[0098] 서열 번호 17 내지 32 또는 49 내지 64 중의 적어도 하나의 연속된 아미노산의 적어도 70 내지 100%를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 같은, 본원에 제공된 정보를 사용하여, 이의 변이체 또는 컨센서스 서열, 또는 이를 서열 중의 적어도 하나를 포함하는 기탁된 벡터, 적어도 하나의 항-CD22 항체를 암호화하는 본 발명의 핵산 분자를 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 수득할 수 있다.

[0099] 본 발명의 핵산 분자는 mRNA, hnRNA, tRNA 또는 어떠한 다른 형태와 같은 RNA의 형태, 또는 클로닝에 의해 수득되거나 합성적으로 생산된 cDNA 및 계놈성 DNA를 포함하는 DNA의 형태 또는 이의 어떠한 조합일 수 있다. DNA는 삼본체, 이본체 또는 일본체일 수 있거나, 이의 어떠한 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 하나의 체 중의 특정의 일부는 센스 체로서 또한 알려진, 암호화 체일 수 있거나, 항-센스 체로서 또한 언급된 비-암호화 체일 수 있다.

[0100] 본 발명의 분리된 핵산 분자는 임의로 하나 이상의 인트론, 예를 들면, 적어도 하나의 중쇄(예를 들면, 서열 번호 33 내지 48) 또는 경쇄(예를 들면, 서열 번호 1 내지 16)와 같은 적어도 하나의 CDR의 적어도 하나의 명시된 부위, 그러나 이에 한정되지 않는 부위를 지닌, 개방 판독 프레임(ORF)를 포함하는 핵산 분자; 항-CD22 항체 또는 가변 영역에 대한 암호화 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 위에서 기술한 것들과는 실질적으로 상이하지만, 유전 코드의 축퇴성으로 인하여, 본원에 기술되고/되거나 당해 분야에 공지된 적어도 하나의 항-CD22 항체를 여전히 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론, 유전 코드는 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 특이적인 항-CD22 항체를 암호화하는 이러한 변성 핵산 변이체를 생성하는 것은 당해 분야의 기술자에게 통상적일 수 있으며(참조: 예를 들면, Ausubel, et al., 상기 참조), 이러한 핵산 변이체는 본 발명내에 포함된다. 본 발명의 분리된 핵산 분자의 비-제한적 예는 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC 가변 영역 및 LC 가변 영역을 각각 암호화하는 핵산의 비-제한적 예에 상응하는 서열 번호 1 내지 16 및 33 내지 48을 포함한다.

[0101] 본원에 나타낸 바와 같이, 항-CD22 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 본 발명의 핵산 분자는 자체로서 항체 골격의 아미노산 서열을 암호화하는 것들, 전체 항체 또는 이의 부위에 대한 암호화 서열, 항체, 단편 또는 부위에 대한 암호화 서열, 및 또한 스플라이싱 및 폴리아데닐화 시그날(예를 들면, mRNA의 리보소ーム 결합 및 안정성)을 포함하는 전사, mRNA 프로세싱에 역할을 담당하는, 전사된, 해독되지 않은 서열과 같은, 비-암호화 5' 및 3' 서열을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 추가의 비-암호화 서열과 함께, 적어도 하나의 인트론과 같은, 위에서 언급한 추가의 암호화 서열의 존재 또는 부재하에, 적어도 하나의 시그날 리더 또는 융합 웨بت아이드의 암호화 서열과 같은, 적어도 하나의 시그날 리더 또는 융합 웨بت아이드의 암호화 서열과 같은 추가의 서열; 추가의 기능성을 제공하는 것들과 같은 추가의 아미노산을 암호화하는 추가의 암호화 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 항체를 암호화하는 서열은 항체 단편 또는 부위를 포함하는 융합된 항체의 정제를 촉진시키는 웨بت아이드를 암호화하는 서열과 같은, 마커 서열에 융합될 수 있다.

본원에 기술된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드에 선택적으로 하이브리드화된 폴리뉴클레오타이드

[0103] 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드에 대한 선택적인 하이브리드화 조건 하에서 하이브리드화하는 분리된 핵산을 제공한다. 따라서, 당해 구현예의 폴리뉴클레오타이드는 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산을 분리하고/하거나 검출하고/하거나 정량하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 사용하여 기탁된 라이브러리내 부분 또는 완전한 길이의 클론을 확인하거나, 분리하거나 증폭시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 분리된 계놈성 또는 cDNA 서열이거나, 사람 또는 포유동물 핵산 라이브러리로부터 cDNA에 대해 또한 상보성이다.

[0104] 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 적어도 80%의 완전한 길이의 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90%의 완전한 길이의 서열, 및 보다 바람직하게는 적어도 95%의 완전한 길이의 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 드문 서열의 표시를 증가시키도록 표준화시킬 수 있다. 낮거나 중간의 엄격한(stringency) 하이브리드화 조건은 전형적으로, 그러나 비배타으로 상보성 서열과 비교하여 감소된 서열 동질성을 갖는 서열과 함께 사용된다. 중간 및 고 엄격성 조건을 동질성이 보다 큰 서열에 임의로 사용할 수 있다. 저 엄격성 조건은 약 70% 서열 동질성을 갖는 서열의 선택적인 하이브리드화를 허용하며 이종상동성 또는 유사유전사(paralogous) 서열을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0105] 임의로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본원에 기술된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 항체의 적어도 일부를 암호화할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 대한 선택적인 하이브리드화를 위해 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다(참조: 예를 들면, 각각의 전문이 본원에 참조로 혼입된 Ausubel, 상기 참조; Colligan, 상기 참조).

핵산의 작제

[0107] 본 발명의 분리된 핵산은 당해 분야에 잘 공지된 것으로서, (a) 재조합체 방법, (b) 합성 기술, (c) 정제 기술, 또는 이의 조합을 사용하여 제조할 수 있다.

[0108] 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 외의 서열을 편리하게 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중-클로닝 부위를 핵산내로 삽입하여 폴리뉴클레오타이드의 분리를 보조할 수 있다. 또한, 해독가능한 서열을 삽입하여 본 발명의 해독된 폴리뉴클레오타이드의 분리시 보조할 수 있다. 예를 들면, 헥사-히스티딘 마커 서열은 본 발명의 단백질을 정제하기 위한 편리한 수단을 제공한다. 암호화 서열을 제외한 본 발명의 핵산은 임의로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터(adapter), 또는 링커이다.

[0109] 추가의 서열을 이러한 클로닝 및/또는 발현 서열에 가하여 폴리뉴클레오타이드의 클로닝 및/또는 발현시 이들의 기능을 최적화시키거나, 폴리뉴클레오타이드의 분리시 보조하거나, 폴리뉴클레오타이드의 세포내로의 도입을 개선시킬 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터, 및 링커의 사용은 당해 분야에 잘 공지되어 있다(참조: 예를 들면, Ausubel, 상기 참조; 또는 Sambrook, 상기 참조).

[0110] 핵산을 제거하기 위한 재조합체 방법

[0111] RNA, cDNA, 게놈성 DNA, 또는 이의 어떠한 조합과 같은, 본 발명의 분리된 핵산 조성물은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 어떠한 수의 클로닝 방법들을 사용하여 생물학적 공급원으로부터 분리할 수 있다. 일부 구현예에서, 엄격한 조건하에서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 선택적으로 하이브리드화하는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 cDNA 또는 게놈성 DNA 라이브러리내 바람직한 서열을 확인한다. RNA의 분리, 및 cDNA 및 게놈성 라이브러리의 제거는 당해 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지되어 있다(참조: 예를 들면, Ausubel, 상기 참조; 또는 Sambrook, 상기 참조).

[0112] 핵산 스크리닝 및 분리 방법

[0113] cDNA 또는 게놈성 라이브러리는 본원에 기재된 것과 같은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 서열을 기본으로 한 프로브를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 프로브를 사용하여 게놈성 DNA 또는 cDNA 서열에 하이브리드화시킴으로써 동일하거나 상이한 유기체내 동종 유전자를 분리할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 하이브리드화의 다양한 정도의 엄격성이 검정에 사용될 수 있고; 다른 하이브리드화 또는 세척 매질이 엄격할 수 있음을 인식할 것이다. 하이브리드화 조건이 보다 엄격해짐에 따라, 이본체 형성이 발생하기 위해서 프로브와 표적 사이에 보다 큰 정도의 상보성이 존재해야만 한다. 엄격성의 정도는 온도, 이온 강도, pH 및 포름아미드와 같은 부분적으로 변성인 용매의 존재 중의 하나 이상에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 하이브리드화의 엄격성은 예를 들면, 0% 내지 50%의 범위내에서 포름아미드의 농도의 조작을 통해 반응물 용액의 극성을 변화시킴으로써 편리하게 변한다. 검출가능한 결합에 요구되는 상보성(서열 동질성)의 정도는 하이브리드화 매질 및/또는 세척 매질의 엄격성에 따라 변할 것이다. 상보성 정도는 최적으로 100%, 또는 70 내지 100%, 또는 이의 어떠한 범위 또는 핵심일 것이다. 그러나, 프로브 및 라이브러리내 약간의 서열 변이도 하이브리드화 및/또는 세척 매질의 엄격성을 감소시킴으로써 보상될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0114] RNA 또는 DNA의 증폭 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있으며 본원에 나타낸 기술 및 안내를 기본으로 하여, 과도한 실험없이 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0115] DNA 또는 RNA 증폭의 공지된 방법은 폴리머라제 쇄 반응(PCR) 및 관련된 증폭 공정(참조: 예를 들면, Mullis 등의 미국 특허 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188; Tabor 등의 미국 특허 4,795,699 및 4,921,794; Innis의 미국 특허 5,142,033; Wilson 등의 미국 특허 제5,122,464호; Innis 등의 미국 특허 5,091,310; Gyllensten 등의 미국 특허 5,066,584; Gelfand 등의 미국 특허 4,889,818; Silver 등의 미국 특허 4,994,370; Biswas의 미국 특허 4,766,067; Ringold의 미국 특허 4,656,134] 및 이본체 DNA 합성용 주형으로서 표적 서열에 대한 항-센스 RNA를 사용하는 RNA 매개된 증폭(참조: Malek 등의 미국 특허 5,130,238, 상표명 NASBA)을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 이들 문헌의 전체 내용은 본원에 참조로 혼입된다(참조: 예를 들면, Ausubel, 상기 참조; 또는 Sambrook, 상기 참조).

[0116] 예를 들면, 폴리머라제 쇄 반응(PCR) 기술을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 서열 및 게놈성 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 관련 유전자를 증폭시킬 수 있다. 시험관내 증폭 방법에서 PCR 및 다른 것은 예를 들면, 핵산 서열분석, 또는 다른 목적을 위해, 발현될 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 클로닝하고, 핵산을 제조하여 시료 속에서 바람직한 mRNA의 존재를 검출하기 위해 프로브로서 사용하는데 유용할 수 있다. 시험관내 증폭 방법을 통해 숙련가가 지시하기에 충분한 기술의 예는 문헌[참조: Berger, 상기 참조, Sambrook, 상기 참조, 및 Ausubel, 상기 참조, 및 또한 Mullis 등의 미국 특허 4,683,202(1987); 및 Innis 등의 PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, Calif.(1990)]에서

찾을 수 있다. 게놈성 PCR 증폭을 위한 시판되는 키트는 당해 분야에 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Advantage-GC Genomic PCR Kit(제조원: Clontech)]. 추가로, 예를 들면, T4 유전자 32 단백질(제조원: Boehringer Mannheim)을 사용하여 긴 PCR 생성물의 수율을 개선시킬 수 있다.

[0117] 핵산을 작제하기 위한 합성 방법

본 발명의 분리된 핵산은 또한 공지된 방법(참조: 예를 들면, Ausubel 등, 상기 참조)에 의한 직접적인 화학적 합성으로 제조할 수 있다. 화학적 합성은 일반적으로 일본쇄 올리고뉴클레오타이드를 생산하며, 이는 상보성 서열과의 하이브리드화에 의해, 또는 주형으로서 일본쇄를 사용하는 DNA 폴리머라제를 사용한 중합에 의해 이본쇄 DNA로 전환될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, DNA의 화학적 합성이 약 100 이상의 염기의 서열로 제한될 수 있다고 해도, 보다 긴 서열이 보다 짧은 서열의 연결에 의해 수득될 수 있음을 인식할 것이다.

[0119] 재조합체 발현 카세트

본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 포함하는 재조합체 발현 카세트를 제공한다. 본 발명의 핵산 서열은 예를 들면, 본 발명의 항체를 암호화하는 cDNA 또는 게놈성 서열을 사용하여 적어도 하나의 바람직한 숙주 세포내로 도입될 수 있는 재조합체 발현 카세트를 작제할 수 있다. 재조합체 발현 카세트는 전형적으로 의도된 숙주 세포 내에서 폴리뉴클레오타이드의 전사를 지시할 전사 개시 조절 서열에 작동적으로 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 전형적으로 포함할 것이다. 이종 및 비-이종(즉, 내인성) 프로모터 둘다를 사용하여 본 발명의 핵산의 발현을 지시할 수 있다.

[0121] 일부 구현에에서, 프로모터, 인핸서 또는 다른 성분으로서 제공되는 분리된 핵산을 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 비-이종 형태의 적절한 위치(상부, 하부 또는 인트론내)에 도입시켜 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 상향 또는 하향 조절할 수 있다. 예를 들어, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체내 또는 시험관내에서 변경될 수 있다.

[0122] 벡터 및 숙주 세포

본 발명은 또한 본 발명의 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터, 재조합체 벡터로 유전적으로 가공된 숙주 세포, 및 당해 분야에 잘 공지된 바와 같은, 재조합체 기술에 의한 적어도 하나의 항-CD22 항체의 생산에 관한 것이다(참조: 예를 들면, 각각의 전문이 본원에 참조로 혼입된 Sambrook, et al., 상기 참조; Ausubel, et al., 상기 참조).

[0124] 폴리뉴클레오타이드는 숙주 내에서 증식하기 위한 선택가능한 마커를 함유하는 벡터에 임의로 결합될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 인산칼슘 침전물과 같은 침전물 속에, 또는 하전된 지질과의 복합체 속에 도입된다. 벡터가 바이러스인 경우, 이는 적절한 패키징 세포주를 사용하여 시험관내에서 패키징된 후 숙주 세포내로 형질도입될 수 있다.

[0125] DNA 삽입체는 적절한 프로모터에 작동적으로 연결되어야 한다. 발현 작제물은 전사 개시, 종결을 위한 부위 및, 전사된 영역내에서 해독용 리보소ーム 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 작제물에 의해 발현된 성숙한 전사체의 암호화 부위는 바람직하게는 포유동물 또는 진핵 세포 발현을 위해 바람직한 UAA 및 UAG와 함께, 해독될 mRNA의 말단에 적절하게 위치한 개시 및 종결 코돈(예를 들면, UAA, UGA 또는 UAG)에서 개시하는 해독을 포함할 것이다.

[0126] 발현 벡터는 바람직하게는 그러나 임의로 적어도 하나의 선택가능한 마커를 포함할 것이다. 이러한 마커는 예를 들면, 메토트렉세이트(MTX), 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR, 미국 특허 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017), 진핵 세포 배양물을 위한 암피실린, 네오마이신(G418), 마이코 페놀산, 또는 글루타민 신테타제(GS, 미국 특허 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) 내성, 및 이. 콜라이(E. coli) 및 다른 세균 또는 원핵세포(상기 특허는, 전문이 본원에 참조로 혼입된다)에서 배양하기 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 내성 유전자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상술한 숙주 세포에 대한 적절한 배양 매질 및 조건은 당해 분야에 공지되어 있다. 적합한 벡터는 숙련가에게 용이하게 명백할 것이다. 숙주 세포내로의 벡터 작제물의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염, 양이온성 지질-매개된 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법은 문헌(참조: Sambrook, 상기 참조, Chapters 1-4 및 16-18; Ausubel, 상기 참조, Chapters 1, 9, 13, 15, 16)과 같이, 당해 분야에 기술되어 있다.

[0127] 본 발명의 적어도 하나의 항체는 융합 단백질과 같은 변형된 형태로 발현될 수 있으며, 분비 시그널 뿐 아니라,

추가의 이종 기능성 영역도 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역을 항체의 N-말단에 가하여 숙주 세포내에서, 정제 동안, 또는 후속적인 취급 및 저장 동안, 안전성 및 지속성을 개선시킬 수 있다. 또한, 웹타이드 잔사를 본 발명의 항체에 가하여 정제를 촉진시킬 수 있다. 이러한 영역은 항체 또는 이의 적어도 하나의 단편의 최종 제조 전에 제거할 수 있다. 이러한 방법은 문헌(참조: Sambrook, 상기 참조, Chapters 17.29-17.42 및 18.1-18.74; Ausubel, 상기 참조, Chapters 16, 17 및 18)과 같은 많은 표준 실험 매뉴얼에 기술되어 있다.

[0128] 당해 분야의 통상의 기술자들은 본 발명의 단백질을 암호화하는 핵산의 발현을 위해 이용가능한 다수의 발현 시스템을 인지하고 있다.

[0129] 대안적으로, 본 발명의 핵산은 본 발명의 항체를 암호화하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포내에서 터닝 온(turning on)(조작에 의해)함으로서 숙주 세포내에서 발현될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 전문이 본원에 참조로 혼입된 미국 특허 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746, 및 5,733,761에 기술된 바와 같이, 당해 분야에 잘 공지되어 있다.

[0130] 항체, 명시된 이의 부위 또는 변이체의 생산에 유용한 예시적인 숙주 배양물의 예는 포유동물 세포이다. 포유동물 세포 시스템은, 종종 포유동물 세포 혼탁액 또는 생물반응기를 또한 사용할 수 있다고 해도 세포의 단층의 형태로 존재할 것이다. 완벽한 글리코실화된 단백질을 발현할 수 있는 적합한 숙주 세포주의 수는 당해 분야에서 개발되어 왔으며 COS-1(예를 들면, ATCC CRL 1650), COS-7(예를 들면, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21(예를 들면, ATCC CRL-10), CHO(예를 들면, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1(예를 들면, ATCC CRL-26) 세포주, Cos-7 세포, CHO 세포, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 세포, HeLa 세포 등을 포함하며, 이들 세포는 예를 들면, 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션[American Type Culture Collection, 버지니아주 마나사스 소재, Va. (www.atcc.org)]으로부터 용이하게 이용가능하다. 바람직한 숙주 세포는 흑색종 및 림프종 세포와 같은 림프구 기원의 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포는 P3X63Ag8.653 세포(ATCC 수탁 번호 CRL-1580) 및 SP2/0-Ag14 세포(ATCC 수탁 번호 CRL-1851)이다. 특히 바람직한 양태에서, 재조합체 세포는 P3X63Ab8.653 또는 SP2/0-Ag14 세포이다.

[0131] 이들 세포를 위한 발현 벡터는 복제 기원: 프로모터[예를 들면, 레이트(late) 또는 얼리(early) SV40 프로모터, CMV 프로모터(미국 특허 5,168,062; 5,385,839), HSV tk 프로모터, pgk(포스포글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터(미국 특허 5,266,491), 적어도 하나의 사람 면역글로불린 프로모터; 인핸서 및/또는 프로세싱 정보 부위, 예를 들면, 리보소ーム 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위(예를 들면, SV40 거대 T Ag 폴리 A 첨가 부위), 및 전사 종결 서열과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 다음의 발현 조절 서열 중의 하나 이상을 포함할 수 있다(참조: 예를 들면, Ausubel et al., 상기 참조; Sambrook, et al., 상기 참조). 본 발명의 핵산 또는 단백질의 생산에 유용한 다른 세포는 공지되어 있고/있거나 예를 들면, 세포주 및 하이브리도마의 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 카탈로그(www.atcc.org) 또는 다른 공지되거나 시판되는 공급원으로부터 이용가능하다.

[0132] 진핵 숙주세포를 사용하는 경우, 폴리아데닐화 또는 전사 종결인자 서열이 벡터내로 전형적으로 혼입된다. 종결인자 서열의 예는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이다. 전사의 정밀한 스플라이싱을 위한 서열이 또한 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예는 SV40으로부터의 VP1 인트론이다[참조: Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781(1983)]. 또한, 숙주 세포내에서 복제를 조절하는 유전자 서열을 당해 분야에 공지된 바와 같이, 벡터내로 혼입시킬 수 있다.

항체의 생산

[0134] 본 발명의 적어도 하나의 항-CD22 항체는 당해 분야에 잘 공지된 바와 같이, 세포주, 혼합된 세포주, 무한증식 세포 또는 무한증식 세포의 클로날 집단에 의해 임의로 생산될 수 있다[참조: 예를 들면, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y.(1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.sup.nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989). Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY(1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y.,(1997-2001), 이를 각각은, 전문이 본원에 참조로 혼입되어 있다].

[0135] 하나의 시도에서, 하이브리도마는 적합한 무한증식 세포주(예를 들면, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NS0, NS1, NS2, AE-

1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MA1, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A)와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 흑색종 세포주) 등, 또는 이종골수종, 이의 융합 생성물, 또는 이로부터 기원한 어떠한 세포 또는 융합세포, 또는 당해 분야에 공지된 바와 같은(참조: 예를 들면, www.atcc.org, www.lifetech.com.) 어떠한 다른 적합한 세포주를 분리되거나 클로닝된 비장, 말초 혈액, 림프구, 편도선, 또는 다른 면역 또는 B 세포 함유 세포, 또는 내인성 또는 이종 핵산으로서, 재조합체 또는 내인성, 바이러스, 세균, 조류, 원핵세포, 양서류, 곤충, 과충류, 어류, 포유동물, 설치류, 말, 양, 염소, 양, 영장류, 진핵세포, 게놈성 DNA, cDNA, rDNA, 미토콘드리아 DNA 또는 RNA, 엽록체 DNA 또는 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 일본쇄, 이본쇄 또는 삼본쇄, 하이브리드화된 등 또는 이의 어떠한 조합과 같은 종쇄 또는 경쇄 고정 또는 가변 또는 골격 또는 CDR 서열과 융합시켜 생산한다(참조: 예를 들면, Ausubel, 상기 참조, 및 Colligan, Immunology, 상기 참조, chapter 2, 이의 전문은 본원에 참조로 혼입된다).

[0136] 어떠한 다른 적합한 숙주 세포 또한 본 발명의 항체, 이의 구체적인 단편 또는 변이체를 암호화하는 이종 또는 내인성 핵산을 발현하는데 사용될 수 있다. 융합된 세포(하이브리도마) 또는 재조합체 세포는 선택적인 배양 조건 또는 다른 적합한 공지된 방법에 의해 분리되어, 제한 회석 또는 세포 분류, 또는 다른 공지된 방법으로 클로닝될 수 있다. 바람직한 특이성을 지닌 항체를 생산하는 세포는 적합한 검정(예를 들면, ELISA)으로 선택할 수 있다.

[0137] 본 발명의 항체는 또한 이들의 우유 속에 이러한 항체를 생산하는, 염소, 소, 말, 양 등과 같은 유전자이식 동물 또는 포유동물을 제공하기 위해 적어도 하나의 항-CD22 항체 암호화 핵산을 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 공지된 방법(참조: 예를 들면, 이들 각각이 본원에 참조로 혼입된 미국 특허 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616, 5,565,362; 5,304,489를 참조하지만 이에 한정되지 않는다)을 사용하여 제공할 수 있다.

[0138] 본 발명의 항체는 이러한 항체를 생산하는 유전자이식 식물 및 배양된 색물 세포(예를 들면, 담배 및 감자를 포함하나, 이에 한정되지 않음)를 제공하기 위해 적어도 하나의 항-CD22 항체 암호화 핵산을 사용하여 추가로 제조할 수 있다. 비-제한적 예로서, 재조합체 단백질을 발현하는 유전자이식 담배 잎을 성공적으로 사용하여 예를 들면, 유도성 프로모터를 사용하여 다양한 재조합체 단백질을 제공하여 왔다[참조: 예를 들면, Cramer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240:95-118 (1999) 및 이에 인용된 참조 문헌]. 또한, 유전자이식 옥수수가 사용되어 다른 재조합체 시스템에서 생산되거나 천연 공급원으로부터 정제된 것들과 동등한 생물학적 활성을 지닌 시판되는 생산 수준으로 포유동물 단백질을 발현시켜 왔다[참조: 예를 들면, Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147(1999) 및 이에 인용된 참조 문헌]. 항체는 또한 담배 종자 및 감자 괴경을 포함하는, 일본쇄 항체(scFv)와 같은, 항체 단편을 포함하는 유전자이식 식물 종자로부터 다양으로 생산되어 왔다[참조: 예를 들면, Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109(1998) 및 이에 인용된 참조 문헌]. 따라서, 본 발명의 항체는 공지된 방법에 따라, 유전자이식 식물을 사용하여 생산할 수 있다[참조: 예를 들면, Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108(October, 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7(1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6(1995); Whitelam et al., Biochem Soc. Trans. 22:940-944(1994); 및 이에 인용된 참조 문헌]. 상기 참조 문헌 각각은, 전문이 본원에 참조로 혼입된다.

항체의 정제

[0140] 항-CD22 항체는 단백질 A 정제, 단백질 G 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로즈 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하나, 이에 한정되지 않는 잘 공지된 방법에 의해 재조합체 세포 배양물로부터 회수되고 정제될 수 있다. 고 성능 액체 크로마토그래피("HPLC")를 또한 정제를 위해 사용할 수 있다[참조: 예를 들면, Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y.,(1997-2001), 예를 들면, chapters 1, 4, 6, 8, 9, 및 10, 각각은, 전문이 본원에 참조로 혼입된다].

[0141] 본 발명의 항체는 천연적으로 정제된 생성물, 화학 합성 과정의 생성물, 및 예를 들면, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유동물 세포를 포함하는 진핵세포 숙주로부터의 재조합체 기술에 의해 생산된 생성물을 포함한다. 재조합체 생산 과정에서 사용된 숙주에 따라서, 본 발명의 항체는 글리코실화될 수 있거나 비-글리코실화될 수 있으며, 글리코실화되는 것이 바람직하다. 이러한 방법은 문헌(참조: Sambrook, 상기 참조, Sections 17.37-17.42; Ausubel, 상기 참조, Chapters 10, 12, 13, 16, 18 및 20, Colligan, Protein Science, 상기 참조,

Chapters 12-14, 모두의 전문은 본원에 참조로 혼입된다)과 같은 많은 표준 실험실 매뉴얼에 기술되어 있다.

[0142] 정제된 항체는 예를 들면, ELISA, ELISPOT, 유동 세포분석, 면역세포학, Biacore[®] 분석, Sapidyne KinExATM 동력학 배출 검정, SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯, 또는 HPLC 분석 및 또한 본원에 기술된 다른 기능성 검정에 의해 특성화될 수 있다.

포유동물 세포내에서, CD22 항체의 클로닝 및 발현

[0144] 대표적인 포유동물 발현 벡터는 적어도 하나의 프로모터 성분을 함유하며, 이는 mRNA, 항체 암호화 서열, 및 전사의 종결 및 전사체의 폴리아데닐화에 요구되는 시그날의 개시를 매개한다. 추가의 성분은 인핸서(enhancer), 코작 서열(Kozak sequence) 및, RNA 스플라이싱을 위한 공여자 및 수용체 부위에 의해 플랭킹(flanking)된 개재 서열(intervening sequence)을 포함한다. 고도로 효율적인 전사는 SV40으로부터의 얼리(early) 및 레이트(late) 프로모터, 레트로바이러스로부터의 긴 말단 반복체(LTRS), 예를 들면, RSV, HTLV, HIVI 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 얼리 프로모터를 사용하여 달성할 수 있다. 그러나, 세포 성분을 또한 사용할 수 있다(예를 들면, 사람 액틴 프로모터). 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 적합한 발현 벡터는 예를 들면, pIRESpneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, 또는 pLNCX(제조원: 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 Clonetech Labs), pcDNA3.1(+/-), pcDNA/Zeo(+/-) 또는 pcDNA3.1/Hygro(+/-)(제조원: Invitrogen), PSVL 및 PMSG(제조원: 스웨덴 업살라 소재의 Pharmacia), pRSVcat(ATCC 37152), pSV2dhfr(ATCC 37146) 및 pBC12MI(ATCC 67109)와 같은 벡터를 포함한다. 사용될 수 있는 포유동물 숙주 세포는 사람 HeLa 293, H9 및 저켓 세포(Jurkat cell), 마우스 NIH3T3 및 C127 세포, Cos 1, Cos 7 및 CV 1, 메추라기 QC1-3 세포, 마우스 L 세포 및 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포를 포함한다.

[0145] 대안적으로, 유전자는 염색체내로 통합된 유전자를 함유하는 안정한 세포주 속에서 발현될 수 있다. dhfr, gpt, 네오마이신, 또는 하이그로마이신과 같은 선택가능한 마커를 사용한 동시-형질감염은 형질감염된 세포의 확인 및 분리를 허용한다.

[0146] 형질감염된 유전자를 또한 증폭시켜 다량의 암호화된 항체를 발현할 수 있다. DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타제) 마커는 목적한 유전자의 수백개 또는 심지어 수천개의 카피를 수반하는 세포주를 개발하는데 유용하다. 다른 유용한 선택마커는 효소 글루타민 신타제(GS)[참조: Murphy, et al., Biochem. J. 227:277-279(1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10:169-175(1992)]이다. 이들 마커를 사용하여, 포유동물 세포를 선택성 배지에서 성장시키고 최대 내성을 갖는 세포를 선택한다. 이들 세포주는 염색체내로 통합된 증폭된 유전자(들)을 함유한다. 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 및 NSO 세포가 항체 생산에 흔히 사용된다.

CHO 세포내에서 클로닝 및 발현

[0148] DNA 및 탈인산화된 벡터를 암호화하는 분리된 가변 및 고정 영역을 T4 DNA 리가제에 연결시킨다. 이. 콜라이 HB101 또는 XL-1 블루 세포(Blue cell)를 이후에 형질전환시키고 예를 들면, 제한 효소 분석을 사용하여, 플라스미드 pC4 내로 삽입된 단편을 함유하는 세균을 확인한다.

[0149] 활성의 DHFR 유전자를 결여하는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포가 형질감염에 사용된다. 5 μ g의 발현 플라스미드 pC4를 0.5 μ g의 플라스미드 pSV2-neo로 지질감염을 사용하여 동시형질감염시킨다. 플라스미드 pSV2neo는 우세한 선택가능한 마커, G418을 포함하는 항생제의 그룹에 내성을 부여하는 효소를 암호화하는 Tn5로부터의 neo 유전자를 함유한다. 세포를 1 μ g/ml G418이 보충된 알파 마이너스 MEM 속에 씨딩(seeding)한다. 2일 후, 세포에 트립신처리하고, 10, 25, 또는 50 ng/ml의 메토트렉세이트 및 1 μ g/ml의 G418이 보충된 알파 마이너스 MEM 속에 하이브리도마 클로닝 플레이트(제조원: 독일 소재의 Greiner) 속에 씨딩한다. 약 10 내지 14일 후, 단일 클론을 트립신 처리한 후 6-웰 페트리 디쉬 또는 10ml의 플라스크 속에 상이한 농도의 메토트렉세이트(50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM)를 사용하여 씨딩한다. 최대 농도의 메토트렉세이트에서 성장하는 클론을 이후에 심지어 보다 높은 농도의 메토트렉세이트(1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM)를 함유하는 새로운 6-웰 플레이트로 이전시킨다. 100 내지 200mM의 농도에서 성장하는 클론이 수득될 때까지 동일한 과정을 반복한다. 목적한 유전자 생성물의 발현을 예를 들면, SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯(Western blot), ELISA, 또는 역상 HPLC 분석으로 분석한다.

항-CD22 항체 조성물

[0151] 본 발명은 또한 본원에 기술된 바와 같고/같거나 비-천연적으로 발생하는 조성물, 혼합물 또는 형태로 제공되는 당해 분야에 공지된 바와 같은, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 이

상의 이의 항-CD22 항체를 포함하는 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 본원에 기술된 항체의 CDR 영역의 연속된 아미노산의 70 내지 100%, 또는 이의 명시된 단편, 도메인 또는 변이체로 이루어진 그룹 중에서 선택된 항-CD22 항체 아미노산 서열의 적어도 하나의 또는 2개의 완전한 길이의, C- 및/또는 N-말단적으로 결실된 변이체, 도메인, 단편, 또는 명시된 변이체를 포함하는 비-천연적으로 발생하는 조성물을 포함한다. 바람직한 항-CD22 항체 조성물은 본원에 기술된 항-CD22 항체 서열의 부위를 함유하는 적어도 하나의 CDR 또는 LBR로서 적어도 1개 또는 2개의 완전한 길이의 단편, 도메인 또는 변이체를 포함한다. 추가의 바람직한 조성물은 본원에 기술된 항-CD22 Ab의 CDR 영역의 70 내지 100% 중의 적어도 하나의 40 내지 99%를 포함한다. 이러한 조성물 퍼센트는 당해 분야에 공지되거나 본원에 기술된 바와 같이, 액체 또는 건조 용액, 혼합물, 혼탁액, 유액 또는 콜로이드로서 중량, 용적, 농도, 몰농도, 또는 몰랄농도(molality)에 대한 것이다.

[0152]

본 발명의 항-CD22 항체 조성물은 적어도 하나의 TNF 길항체(예를 들면, TNF 항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 또는 단편, 이의 융합 단백질, 또는 소 분자 TNF 길항체), 항류마티스제(예를 들면, 메토트렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오클루코즈, 아자티오프린, 에타네르셉트, 금 나트륨 티오말레이트, 하이드록시클로로퀸, 셀페이트, 레플루노마이드, 셀파살진), 근육 이완제, 마약, 비-스테로이드 소염 약물(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근육 차단제, 항미생물제(예를 들면, 아미노글리코시드, 항진균제, 항기생충제, 항바이러스제, 카르바페넴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤리드, 페니실린, 셀폰아미드, 테트라사이클린, 다른 항미생물제), 항건선제, 코르티코스테로이드, 아나볼릭 스테로이드, 당뇨병 관련 제제, 무기물, 영양제, 갑상선 제제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해제, 구토방지제, 항궤양제, 완화제, 항응고제, 에리트로피에틴(예를 들면, 에포에틴 알파), 필그라스팀(예를 들면, G-CSF, 뉴포겐), 사르그라모스팀(GM-CSF, 류킨), 면역화, 면역글로불린, 면역억제제(예를 들면, 바실릭시마브, 사이클로스포린, 다클리주마브), 성장 호르몬, 호르몬-대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절인자, 산동제(mydriatic), 안근마비제, 알킬화제, 항대사제, 유사분열 억제제, 방사선약물, 항우울제, 항조제, 항정신병제, 흥분억제제, 죄면제, 교감신경흥분제, 자극제, 도네페질, 타크린, 천식 의약, 베타 효능제, 흡입된 스테로이드, 류코트리엔 억제제, 메틸크산틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사제, 도마제 알파(풀모자임), 사이토킨 또는 사이토킨 길항제 중에서 선택된 적어도 하나를 임의로 추가로 포함하는, 이러한 조절, 치료 또는 치료요법이 요구되는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 적어도 하나의 항-CD22 항체를 포함하는 조성물 또는 약제학적 조성물의 어떠한 적합한 및 유효한 양 중의 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 사이토킨의 비-제한적 예는 IL-1 내지 IL-34 중의 어느 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 용량은 당해 분야에 잘 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2.sup.nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn.(2000); PDR *Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif.(2000), 이들 각각은, 전문이 본원에 참조로 혼입되어 있다].

[0153]

본 발명의 항-CD22 항체 화합물, 조성물 또는 조합은 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친지성 용매, 방부제, 보조제 등과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 어떠한 적합한 보조제 중의 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 보조제가 바람직하다. 이러한 멸균 용액의 비-제한적 예, 및 이의 제조 방법은 문헌[참조: Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co.(Easton, Pa.) 1990]과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 당해 분야에 잘 공지된 바와 같이 또는 본원에 기술된 바와 같은 항-CD22 항체, 단편 또는 변이체 조성물의 투여 방식, 가용성 및/또는 안전성에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체가 통상적으로 선택될 수 있다.

[0154]

본 조성물에 유용한 약제학적 부형제 및 첨가제는 단백질, 웨타이드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물(예를 들면, 모노사카라이드, 디-, 트리-, 테트라-, 및 올리고사카라이드를 포함하는 당; 알디톨, 알돈산, 에스테르화된 당 등과 같은 유도체화된 당; 및 다당류 또는 당 중합체를 포함하는 당)을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 이는 단독 또는 조합으로 1 내지 99.99 중량% 또는 용적%를 포함하는 조합으로 또는 단독으로 존재할 수 있다. 예시적인 단백질 부형제는 사람 혈청 알부민(HSA), 재조합체 사람 알부민(rHA), 젤라틴, 카제인 등과 같은 혈청 알부민을 포함한다. 완충제에서 또한 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/항체 성분은 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 루이신, 이소루이신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파르탐 등을 포함한다. 하나의 바람직한 아미노산은 글리신이다.

[0155]

본 발명에서 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제는 예를 들면, 프리토즈, 말토즈, 갈락토즈, 글루코즈, D-만노즈, 소르보즈 등과 같은 단당류; 락토즈, 슈크로즈, 트레할로즈, 셀로비오즈 등과 같은 이당류; 라피노즈, 멜리지토즈, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등과 같은 다당류; 및 만니톨, 크실리톨, 말티톨, 락티톨, 크실리톨 소르비톨(글루시톨), 미로이노시톨 등과 같은 알디톨을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 바람직한 탄수화물

부형제는 만니톨, 트레할로즈 및 라피노즈이다.

[0156] 항-CD22 항체 조성물은 또한 완충제 또는 pH 조절제를 포함할 수 있으며; 전형적으로, 완충제는 유기산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 시트르산, 아스코르브산, 글루콘산, 카본산, 타르타르산, 석신산, 또는 프탈산의 염과 같은 유기산 염; 트리스, 트로메타민 하이드로클로라이드, 또는 포스페이트 완충제를 포함한다. 본 조성물에서 사용하기 위한 바람직한 완충제는 시트레이트와 같은 유기 산 염이다.

[0157] 추가로, 본 발명의 항-CD22 항체 조성물은 폴리비닐피롤리돈, 피콜(중합체 당), 텍스트란(예를 들면, 사이클로텍스트린, 예를 들면, 2-하이드록시프로필-베타-사이클로텍스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 풍미제, 항미생물제, 감미제, 항산화제, 항정지제, 표면활성제(예를 들면, 폴리소르베이트, 예를 들면, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80"), 지질(예를 들면, 인지질, 지방산), 스테로이드(예를 들면, 콜레스테롤), 및 칼레이트제(예를 들면, EDTA)과 같은 중합체성 부형제/첨가제를 포함할 수 있다.

[0158] 본 발명에 따른 항-CD22 항체, 일부 또는 변이체 조성물에서 사용하기에 적합한 이들 및 추가의 공지된 약제학적 부형제 및/또는 첨가제는 예를 들면, 문헌[참조: "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19.sup.th ed., Williams & Williams, (1995), and in the "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998), 이의 기재내용은 전문이 본원에 참조로 혼입된다]에 나열된 바와 같이, 당해 분야에 공지되어 있다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물(예를 들면, 당류 및 알디톨) 및 완충제(예를 들면, 시트레이트) 또는 중합성 제제이다.

제형

[0159] 위에 나타낸 바와 같이, 본 발명은 바람직하게는 염수 또는 선택된 염이 들어있는 포스페이트 완충액인 안정한 제형, 및 또한 약제학적으로 허용되는 제형 속에 적어도 하나의 항-CD22 항체를 포함하는, 약제 또는 수의학 용도에 적합한 보존제를 함유하는 보존된 용액 및 제형 및 또한 다중 사용 보존 제형을 위해 제공된다. 보존된 제형은 수성 희석제 속의 적어도 하나의 공지된 방부제를 함유하거나, 수성 희석제 속의 적어도 하나의 폐놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 폐닐머쿠릭 니트라이트, 폐녹시에탄올, 포름알데하이드, 클로로부탄올, 염화마그네슘(예를 들면, 헥사하이드레이트), 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이의 혼합물로 이루어진 그룹 중에서 임의로 선택된다. 0.001 내지 5%, 또는 예를 들면, 0.001, 0.003, 0.005, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 또는 이의 어떠한 범위 또는 값과 같지만 이에 제한되지 않는, 이의 어떠한 범위 또는 값과 같은 어떠한 적합한 농도 또는 혼합물도 당해 분야에 공지된 바와 같이 사용될 수 있다. 비-제한적 예는 보존제가 없거나, 0.1 내지 2%의 m-크레졸(예를 들면, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.1 내지 3%의 벤질 알코올(예를 들면, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 0.001 내지 0.5%의 티메로살(예를 들면, 0.005, 0.01), 0.001 내지 2.0%의 폐놀(예를 들면, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005 내지 1.0%의 알킬파라벤(들)(예를 들면, 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%) 등을 포함한다.

[0160] 위에서 나타낸 바와 같이, 본 발명은 포장재 및, 임의로 수성 희석제 속의 적어도 하나의 항-CD22 항체와 처방된 완충제 및/또는 방부제의 용액을 포함하는 적어도 하나의 바이알(vial)을 포함하는 제조 제품을 제공하며, 여기서 상기 포장재는, 이러한 용액이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 시간 이상의 기간에 걸쳐 유지될 수 있음을 나타내는 라벨을 포함한다. 본 발명은 또한 포장재, 동결건조된 적어도 하나의 항-CD22 항체를 포함하는 제1의 바이알, 및 처방된 완충제 또는 방부제의 수성 희석제를 포함하는 제2의 바이알을 포함하는 제조 제품을 추가로 포함하며, 여기서 상기 포장재는, 환자가 적어도 하나의 항-CD22 항체를 수성 희석제 속에서 재구성하여 24시간 이상의 기간에 걸쳐 유지될 수 있는 용액을 형성시키기 위해 지시하는 라벨을 포함한다.

[0162] 본 발명에 따라 사용된 적어도 하나의 항-CD22 항체는 포유동물 세포 또는 형질전환 제제로부터의 것을 포함하는, 재조합체 수단에 의해 제조될 수 있거나, 본원에 기술되거나, 당해 분야에 공지된 바와 같은, 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있다.

[0163] 본 발명의 생성물 중의 적어도 하나의 항-CD22 항체의 범위는, 비록 보다 낮은 농도 및 보다 높은 농도가 작동 가능하며 의도된 전달 비히클에 의존한다고 해도, 습윤/건조 시스템에서의 경우, 재구성시 수득되는 양, 약 1.0

마이크로그램/ml 내지 약 1000 mg/ml의 농도를 포함하는데, 예를 들면, 용액 제형은 경피 페취, 페, 경점막, 또는 삼투압 또는 마이크로 펌프 방법과는 상이할 것이다.

[0164] 바람직하게는, 수성 희석제는 약제학적으로 허용되는 방부제를 임의로 추가로 포함한다. 바람직한 방부제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이의 혼합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것들을 포함한다. 제형속에 사용된 방부제의 농도는 항-미생물 효과를 생성하기에 충분한 농도이다. 이러한 농도는 선택된 방부제에 의존하며 숙련가가 용이하게 결정한다.

[0165] 다른 부형제, 예를 들어, 등장성 제제, 완충제, 항산화제, 방부 향상제를 임의로 및 바람직하게 희석제에 가할 수 있다. 글리세린과 같은 등장성 제제는 공지된 농도에서 일반적으로 사용된다. 생리학적으로 내성인 완충제를 바람직하게 가하여 개선된 pH 조절을 제공한다. 당해 제형은 약 pH 4 내지 약 pH 10, 및 바람직하게는 약 pH 5 내지 약 pH 9, 및 약 6.0 내지 약 8.0의 가장 바람직한 범위와 같은, 광범위한 pH를 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 제형은, pH가 약 6.8 내지 약 7.8이다. 바람직한 완충제는 인산염 완충제, 가장 바람직하게는 인산나트륨, 특히 인산염 완충된 염수(PBS)를 포함한다.

[0166] 트윈 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비톨 모노라우레이트), 트윈 40(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미테이트), 트윈 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탈 모노올레이트), 플루로닉 F68(폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG(폴리에틸렌 글리콜)과 같은 약제학적으로 허용되는 가용화제와 같은 다른 첨가제 또는 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사며 184 또는 188, Pluronic.™ 폴리올, 다른 블록 공-중합체, 및 EDTA 및 EGTA와 같은 칼레이트제를 제형 또는 조성물에 임의로 가하여 응집을 감소시킬 수 있다. 이들 첨가제는, 펌프 또는 플라스틱 용기를 사용하여 제형을 투여하는 경우 특히 유용하다. 약제학적으로 허용되는 표면활성제의 존재는, 단백질이 응집하는 경향을 완화시킨다.

[0167] 본 발명의 제형은 적어도 하나의 항-CD22 항체 및 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤, (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살 또는 이의 혼합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 방부제를 수성 희석액 속에 포함하는 공정으로 제조할 수 있다. 수성 희석액 속에서 적어도 하나의 항-CD22 항체 및 방부제의 혼합은 통상의 용해 및 혼합 과정을 사용하여 수행한다. 적합한 제형을 제조하기 위하여, 예를 들면, 완충된 용액 속에 적어도 하나의 항-CD22 항체의 측정된 양을 상기 단백질 및 방부제가 바람직한 농도에서 제공되기에 충분한 양의 완충된 용액 속에서 바람직한 방부제와 합한다. 당해 공정의 변이는 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 인식될 수 있다. 예를 들어, 성분들이 첨가되는 순서는, 추가의 첨가제가 사용되는지의 여부, 상기 제형이 제조되는 온도 및 pH에 상관없이, 농도 및 사용된 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 모든 인자들이다.

[0168] 특허청구된 제형은 선명한 용액으로써 또는 물, 방부제 및/또는 부형제, 바람직하게는 수성 희석제 속의, 인산염 완충제 및/또는 염수 및 선택된 염을 함유하는 제2 바이알로 재구성된 동결건조된 적어도 하나의 항-CD22 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성을 필요로 하는 이중 바이알은 다수회 재사용될 수 있으며 환자 치료의 단일 또는 다수 주기 동안 충분하므로 현재 이용가능한 보다 편리한 치료 요법을 제공할 수 있다.

[0169] 본원에서 특허청구된 제조 제품은 24시간 직후 또는 그 이상까지의 기간에 걸쳐 투여하는데 유용하다. 따라서, 본원에서 특허청구된 제조 제품은 환자에게 유의적인 장점을 제공한다. 본 발명의 제형은 약 2 내지 약 40°C의 온도에서 임의로 안전하게 저장될 수 있으며 연장된 기간 동안 단백질의 생물학적 활성을 유지시킬 수 있으므로 용액이 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 또는 96 시간 이상의 기간에 걸쳐 사용될 수 있음을 나타내는 포장 라벨을 허용한다. 보존된 희석제가 사용되는 경우, 이러한 표지는 1 내지 12개월, 6개월, 1년 반, 및/또는 2년까지의 사용을 포함할 수 있다.

[0170] 본 발명에서, 적어도 하나의 항-CD22 항체의 용액은 수성 희석제 속에 적어도 하나의 항체를 혼합함을 포함하는 공정에 의해 제조될 수 있다. 혼합은 편리한 용해 및 혼합 과정을 사용하여 수행된다. 적합한 희석제를 제조하기 위해, 예를 들면, 물 또는 완충제 속의 적어도 하나의 항체의 측정된 양을 단백질 및 임의로 방부제 또는 완충제를 바람직한 농도에서 제공하기에 충분한 양으로 합한다. 당해 공정의 변화는 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 인식될 수 있다. 예를 들면, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제가 사용되는지의 여부, 제형이 제조되는 온도 및 pH는 사용된 농도 및 투여 수단을 위해 최적화될 수 있는 모든 인자이다.

[0171] 특허청구된 제품은 환자에게 선명한 용액으로서 또는 수성 희석제를 함유하는 제2의 바이알로 재구성되는 동결

건조된 적어도 하나의 항-CD22 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성을 필요로 하는 이중 바이알을 수회 사용할 수 있으며 환자의 다중 치료 주기에 충분할 수 있으므로 현재 이용가능한 치료 요법보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.

[0172] 특허청구된 제품은 약사, 임상의, 또는 다른 이러한 기관 및 시설, 수성 희석제를 함유하는 제2의 바이알로 재구성된 동결건조된 적어도 하나의 항-CD22 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알에 제공함으로써 환자에게 간접적으로 제공될 수 있다. 이 경우에 선명한 용액은, 적어도 하나의 항체 용액의 보다 적은 부분이 보다 작은 바이알로 전달하기 위해 1회 또는 수회 검색될 수 있는 보다 큰 저장기를 제공하는, 크기가 1 리터 또는 심지어 이상일 수 있으며, 약사 또는 임상의에 의해 이들의 고객 및/또는 환자에게 제공될 수 있다.

[0173] 이들 단일 바이알 시스템들을 포함하는 인식된 장치는 예를 들면, Becton Dickensen(미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, www.bectondickenson.com), Disetronic(스위스 부르그도르프 소재, www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oreg. (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical(영국 피터보로 소재, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp(미국 미네소타주 미네아폴리스 소재, www.mediject.com)에 의해 제조되거나 개발된 것으로서, BD 펜즈, BD AutojectorTM, HumajectTM, NovoPenTM, B-DTM 펜, AutoPenTM, 및 OptiPenTM, GenotropinPenTM, Genotronorm PenTM, Humatro PenTM, Reco-PenTM, Roferon PenTM, BiojectorTM, iJectTM, J-tip Needle-Free InjectorTM, InrajectTM, Medi-JectTM과 같은 용액의 전달을 위한 펜-주입기 장치를 포함한다. 이중 바이알 시스템을 포함하는 인식된 장치는 HumatroPenTM와 같은 재구성된 용액의 전달을 위한 카트리지내 동결건조된 약물을 재구성하기 위한 펜-주입기 시스템을 포함한다.

[0174] 현재 특허청구된 제품은 포장재를 포함한다. 포장재는 조절 기관에 의해 요구된 정보 외에, 제품이 사용될 수 있는 조건을 제공한다. 본 발명의 포장재는 적어도 하나의 항-CD22 항체를 수성 희석제 속에 재구성시켜 용액을 형성하고 당해 용액을 2개의 바이알, 습윤/건조, 제품에 대해 2 내지 24시간 이상의 기간에 걸쳐 사용하도록 하기 위한 지시사항들을 환자에게 제공한다. 단일 바이알, 용액 제품의 경우, 라벨은, 이러한 용액이 2 내지 24시간 이상의 기간에 걸쳐 사용될 수 있음을 나타낸다. 현재 특허청구된 제품은 사람 약제학적 제품 용도로 유용하다.

[0175] 본 발명의 제형은, 적어도 하나의 항-CD22 항체 및 선택된 완충제, 바람직하게는 염수 또는 선택된 염을 함유하는 인산염 완충제를 혼합시킴을 포함하는 공정으로 제조할 수 있다. 수성 희석제 속에서 적어도 하나의 항체 및 완충제를 혼합하는 것은 통상의 용해 및 혼합 과정을 사용하여 수행된다. 적합한 제형을 제조하기 위하여, 예를 들면, 물 또는 완충제 속의 적어도 하나의 항체의 측정된 양을 목적한 완충제와 물 속에서 요구된 농도의 단백질 및 완충제를 제공하기에 충분한 양으로 합한다. 당해 공정의 변화는 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 인식될 수 있다. 예를 들면, 성분들이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제가 사용되는지의 여부, 제형이 제조되는 온도 및 pH는 사용된 투여 농도 및 수단을 위해 최적화될 수 있는 모든 인자들이다.

[0176] 특허청구된 안정하거나 보존된 제형은 선명한 용액으로서 또는 수성 희석제 속의 방부제 또는 완충제 및 부형제를 함유하는 제2의 바이알로 재구성된 동결건조된 적어도 하나의 항-CD22 항체의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성을 필요로 하는 이중 바이알은 다수회 재사용될 수 있으며 환자의 단일 또는 다수의 치료 주기를 위해 충분할 수 있으므로 현재 이용가능한 것 보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.

[0177] 본원에 기술된 안정하거나 보존된 제형 또는 용액인 적어도 하나의 항-CD22 항체는 본 발명에 따라서 SC 또는 IM 주사; 경피, 폐, 경점막, 이식, 삼투압 펌프, 카트리지, 미세 펌프, 또는 당해 분야에 잘 공지된 것으로서, 숙련가에 의해 익숙한 다른 수단을 포함하는 각종의 전달 방법을 통해 환자에게 투여될 수 있다.

치료학적 적용

[0179] CD22는 발달하는 B-세포 및, 립프종 및 급성 및 만성 립프구 백혈병을 포함하는 각종 B-세포 암에서 고도로 특이적인 방식으로 발현된 시글렉 시알산 결합 단백질 수용체 상과의 구성원이다(참조: Crocker et al, *Nature Reviews Immunology* 7, 255-266, 2007). 항-CD22 항체는 CD22를 발현하는 B-세포의 성장을 부정적으로 조절하는 것으로 밝혀져 왔으며 각종 질병의 치료시 관련되어 있다. CD22 항체는 B-세포 의존적 자가면역병을 지닌 환자에서 및 CD22를 발현하는 혈액암을 지닌 환자에서 임상 시험시 시험되어 왔다. 특정의 항체가 세포 복제를 차단하는 부정적인 성장 시그널을 자극하는 공정인, CD22의 타이로신 인산화를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 또한, CD22 항체는 세포내 분비 경로 및 라이소좀내에서 내부화되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 신속하게 내부화

되는 강력한 부정적 성장 조절 특성을 지닌 CD22에 대한 고 친화성 사람 항체는 혈액암, SLE, 류마티스 관절염, 다발경화증 및 또한 다른 B-세포 의존적인 자가면역병과 같은 CD22 관련된 질병에서 사용되는 것이 바람직할 수 있다. 키메라 또는 사람화된 것을 포함하는 항-CD22 Ab 또는 이들 mAb의 어떠한 유도체, 또는 단편은 비-호지킨 림프종, 다른 림프종 및 림프증식 질환, 급성 및 만성 림프세포 백혈병 및, CD22가 관련된 다른 질병의 치료에 사용될 수 있다. 이들 항체는 단일 제제로서 또는 다른 치료제와 함께 사용될 수 있다. 이들은 또한 IL-2, IL-12 및/또는 IFN알파와 같은 다른 종양-면역조절제와 함께 사용될 수 있다. 추가로, 항-CD22 항체는 항-TNF α , IL-12/IL-23, IL-2, GpIIb/IIIa 수용체, CD52, CD20, RSV 단백질, HER2/neu 수용체 등과 같은 다른 모노클로날 항체와 함께; 및 리툭산, 헤르셉틴, 밀로타그, 캄페스, 제발린, 베사르, 에르비툭스, 아바스틴 및 베티비克斯를 포함하는 상업적으로 승인된 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0180] 이들 항체는 단일 제제로서 또는 다른 치료제와 함께 사용될 수 있다. 이들은 또한 IL-2, IL-12, GM-CSF 및/또는 IFN알파와 같은 다른 종양-면역조절제와 함께 사용될 수 있다. 또한, 항-CD22 항체는 항-TNF- α , IL-12/IL-23, IL-2, GpIIb/IIIa 수용체, CD52, CD20, RSV 단백질, HER2/neu 수용체 등; 및 또한 리툭산, 헤르셉틴, 밀로타그, 캄페스, 제발린, 베사르, 에르비툭스, 아바스틴 및 베티비克斯를 포함하는 상업적으로 승인된 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0181] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 적어도 하나의 항-CD22 항체를 사용하여, 당해 분야에 공지되거나 본원에 기술된 바와 같이, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자내에서 적어도 하나의 CD22 관련 질병을 조절하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0182] CD22는 B-세포 암 및 형성장애에서 고 수준으로 발현되는 것으로 알려져 있으며 악성 세포의 세포자멸사의 유도를 포함하는 자기주변 또는 주변 분비 메카니즘을 조절할 수 있다. CD22를 고 수준으로 발현하는 B-세포 암은 확산 거대 B-세포 림프종(DLBC), 여포성 림프종, 급성 및 만성 B-세포 림프세포 백혈병(ALL/CLL), 점막 관련 림프관 림프종(MALT), 외투세포 림프종, 베켓 림프종 및 다른 림프혈장세포 증식(lymphoplasmocytic proliferations)(참조: WHO classification of tumours, 2001)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 항-CD22 항체는 이들 질병만을 또는 다른 화학치료제 및 B-세포 표적화된 생물치료제와 함께 사용될 수 있었다. 또한, B-세포 생산된 자가항체 형성이 관여되는 다른 B-세포 의존적 자가면역병은 전신 홍반 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 다발 경화증(MS)와 같은 질병이며 항-CD22 항체로 치료될 수 있었다.

[0183] 종양 세포 생존 및 질병 진행을 조절하는 CD22에 대해 지시된 항체의 능력은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 종양 성장 상의 항-CD22 mAb의 억제 효과로 확인하였다. CD22를 발현하는 림프종 세포에 대한 특정의 항 CD22 항체의 결합은 시험관내에서 성장을 억제할 수 있음이 보고되었다(참조: Stein et al Epitope specificity of the anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody, LL2. Cancer Immunol. Immunother., 37:293, 1993). 쥐 항-CD22 MAb(원래 EPB-2로 지정되어 현재 LL2로 불림)은 사람화되어 NHL 또는 만성 림프성 백혈구에 사용될 수 있다. 조직학적 연구는, LL2가 확산 및 결절성의, 불량하게 분화된 림프성 백혈구, 및 조직구 거대 세포 림프종을 포함하는, NHL의 실질적으로 모든 경우와 반응성임을 나타내었다. LL2는 고도의 제한된 특이성을 가지며, 단지 정상의 림프절의 초기 중심 및 비장의 백색 펠프의 B-세포 집단과 반응성이다. 더욱이, LL2는 혈액의 정상 B 세포를 포함하는 어떠한 말초 혈액 세포, 또는 어떠한 다른 정상 조직과 반응성이 아니다. LL2는 또한 다른 항-B-세포 림프종 항체로부터 이를 차별화하는, 이의 표적 항원과 관련된 다른 고유 특징을 갖는다. 시험관내 연구는, LL2가 라지(Raji) 림프종 세포주의 표면에서 이의 CD22 표적 항원에 대한 결합 후 내부화되며, 항원이 세포 표면에서 신속하게 재발현됨을 입증하였다. 에프라투주마브로 알려진, 쥐 모노클로날 항체의 사람화된 형태는 사람 림프종 세포주에서 면역조절 및 성장 조절 효과를 갖는다(참조: Carnahan et al., Molecular Immunology 44: 1331, 2007) al. 2001).

[0184] 항-CD22 모노클로날 항체

[0185] CD22는 또한 악성 종양에 대한 진단 인자 및 마커일 수 있다. CD22는 실질적으로 모든 림프종에서 및 대부분의 ALL 및 CLL B-세포 백혈병에서 고 수준으로 발현된다. CD20 표적 치료학적 항체 리툭산의 치료 후 환자 종양내에서 CD22 발현의 증가는, CD22 표적 항체가 리툭산 내성 및 재발된 환자를 치료하는데 사용될 수 있었음을 제안한다(참조: Micallef et al., Blood 118:4053, 2011).

[0186] CD22는 천식/악액질 및 콜 재흡수와 같은 암-관련 이환율에서 유발 인자인 것으로 가설을 세운다. 종양-유도된 악액질(참조: Cahlin et al. 2000) 및 콜 재흡수(후속적인 고칼슘혈증)(참조: Sandhu et al. 1999)은 CD22 뉴아웃(knockout) 마우스에서 약화되는 것으로 밝혀졌다. 암-관련 우울증 및 뇌 종양에 대해 이차적인 뇌 부종은 또한 고 수준의 CD22와 관련되어 왔다(참조: Musselman et al. 2001). 본 발명의 항-CD22 항체는 또한 누드

마우스에서 사람 흑색종 및 사람 전립선 암종 유도된 악액질을 억제할 수 있다.

[0187] 본 발명은 비-호지킨 림프족, 벼켓 림프종, 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL), B-세포, 만성 림프성 백혈병(CLL), 및 모발 세포 백혈병을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 적어도 하나의 악성 질병을 조절하거나 치료하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 이러한 CD22 항체, 방사선 치료요법, 항-혈관형성제, 화학치료제, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제 등의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후 투여함으로써 함께 임의로 사용될 수 있다.

[0188] 본 발명은 또한 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신 발병 소아 류마티스 관절염, 건선 관절염, 강직성 척추염, 위 궤양, 혈청음성 관절증, 골관절염, 염증성 창자병, 궤양 대장염, 전신 홍반 루푸스, 항인지질 증후군, 홍채섬모체염/포도막염/시신경염, 특발성 폐 섬유증, 전신성 혈관염/베게너 육아종증(wegener's granulomatosis), 사코이드증, 고환염/정관절제술 반전 수술, 알레르기/아토피병, 천식, 알레르기 비염, 습진, 알레르기 접촉 피부염, 알레르기 결막염, 과민성 폐렴, 이식, 기관 이식 거부, 이식체-대-숙주병, 전신 염증 반응 증후군, 폐혈증 증후군, 그람 양성 폐혈증, 그람 음성 폐혈증, 배양 부정 폐혈증(culture negative sepsis), 진균 폐혈증, 호중구백혈구 감소성 열, 요로성폐혈증, 수막구균혈증, 외상/출혈, 화상, 이온화 방사선 노출, 급성 췌장염, 성인 호흡 곤란 증후군, 류마티스 관절염, 알코올-유발된 간염, 만성 염증 병리학, 사르코이드증, 크론 병리학(Crohn's pathology), 낫적혈구 빈혈, 당뇨병, 신장증, 아토피병, 고민감성 반응, 알레르기 비염, 건초열, 연증비염, 결막염, 자궁내막증, 천식, 두드러기, 전신 과민증, 피부염, 악성 빈혈, 신생아용혈병, 저혈소판증, 특정 기관 또는 조직의 이식 거부, 신장 이식 거부, 심장 이식 거부, 간 이식 거부, 췌장 이식 거부, 폐 이식 거부, 골수 이식(BMT) 거부, 피부 동종이식 거부, 연골 이식 거부, 혼 이식편 거부(hone graft rejection), 소장 이식 거부, 태아 흥선 이식 거부, 부갑상선 이식 거부, 특정 기관 또는 조직의 이종이식 거부, 동종이식 거부, 항-수용체 고민감성 반응, 그레이브스병(Graves disease), 레이놀드 병(Raynoud's disease), B형 인슐린-내성 당뇨병, 천식, 중증 근육 무력증, 항체-매개된 세포독성, 제III 형 고민감성 반응, 전신 홍반 루푸스, POEMS 증후군(다발신경병, 기관비대증(organomegaly), 내분비병, 모노클로날 감마글로불린병 증, 및 피부 변화 증후군), 다발신경병증, 기관비대증, 내분비병, 모노클로날 감마글로불린병증, 피부 변화 증후군, 항인지질 증후군, 천포창, 공피증, 혼합 결합조직병, 특발성 애디슨병(idiopathic Addison's disease), 진성 당뇨병, 만성 활성 간염, 주요 간경변, 백반증, 혈관염, MI 후 심장절개 증후군(post-MI cardiotomy syndrome), 심장절개술 증후군, 제IV형 고과민증(hypersensitivity), 접촉성 피부염, 과민성 폐렴, 동종이식편 거부반응, 세포내 기관으로 인한 육아종, 약물 민감성, 물질대사/특발성, 윌슨병(Wilson's disease), 혈색증, 알파-1-항트립신 결핍증, 당뇨병성 망막염, 하시모토 갑상선염(hashimoto's thyroiditis), 골다공증, 시상하부-뇌하수체-부신축 평가, 원발담즙성간경변, 갑상선염, 뇌척수염, 악액질, 낭포성 섬유증, 신생아 만성 폐질환, 만성 폐쇄성 폐병(COPD), 가족성적혈구포식성림프조직구증식증(familial hematophagocytic lymphohistiocytosis), 피부학적 상태, 건선, 원형탈모증, 신장 증후군, 신염, 사구체 신염, 급성 신부전, 혈액 투석, 요독증, 독성, 자간전증, okt3 치료요법, 항-cd3 치료요법, 사이토킨 치료요법, 화학치료요법, 방사선 치료요법(예를 들면, 무력증, 빈혈, 악액질 등을 포함하나, 이에 한정되지 않음), 만성 살리실산염 중독, 수면성 무호흡, 비만, 심부전, 부비강염, 염증성 창자병 등 중의 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 적어도 하나의 CD22 매개된 면역 관련 질병을 조절하거나 치료하는 방법을 또한 제공한다. 예를 들면, 문헌[참조: the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, N.J.(1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn.(1998, 2000), 각각은 참조로 전체적으로 혼입된다]을 참조한다.

치료학적 치료

[0189] 본 발명의 어떠한 방법도 적어도 하나의 항-CD22 항체를 포함하는 조성을 또는 약제학적 조성물의 유효량을 이러한 조절, 치료 또는 치료요법이 요구되는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 투여함을 포함하여, CD22 매개된 질환을 치료하는 방법을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 이러한 면역병을 치료하기 위한 동시-투여 또는 조합 치료를 임의로 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 하나의 항-CD22 항체, 이의 명시된 부위 또는 변이체의 투여는 위에서 기술된 바와 같은 적어도 하나의 제제의 전에, 동시에 및/또는 후에 투여함을 추가로 포함한다.

[0190] 전형적으로, 병리학적 상태의 치료는 조성을 속에 함유된 특수 활성에 따라, 단일 또는 다중 투여당 평균, 총 적어도 약 0.01 내지 500 밀리그램의 적어도 하나의 항-CD22 항체, 및 바람직하게는 적어도 약 0.1 내지 100 밀리그램의 항체/환자의 킬로그램 범위의 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성을의 유효량 또는 용량을 투여함으로써

달성된다. 달리는, 유효 혈청 농도는 단일 또는 다중 투여당 0.1 내지 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도를 포함할 수 있다. 적합한 용량은 의학 숙련의에게 알려져 있으며 물론, 특수한 질병 상태, 투여되는 조성물의 특이적인 활성, 및 일부 예에서 치료되는 특수 환자에 의존할 것이며, 목적한 치료학적 양을 달성하기 위해, 반복된 투여, 즉, 특수한 모니터링되거나 계량된 투여량의 반복된 개개 투여를 제공하는 것이 필수적일 수 있으며, 여기서 개개 투여는, 바람직한 1일 투여량 또는 효과가 달성될 때까지 반복된다.

[0192] 바람직한 투여량은 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 및/또는 100 내지 500 mg/kg /투여, 또는 이의 특정 범위, 값 또는 분획을 임의로 포함할 수 있거나, 단일 또는 다중 투여당 0.1, 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5, 2.9, 3.0, 3.5, 3.9, 4.0, 4.5, 4.9, 5.0, 5.5, 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11, 11.5, 11.9, 20, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14.0, 14.5, 4.9, 5.0, 5.5., 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11, 11.5, 11.9, 12, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14, 14.5, 15, 15.5, 15.9, 1.6, 16.5, 16.9, 17, 17.5, 17.9, 18, 18.5, 18.9, 19, 19.5, 19.9, 20, 20.5, 20.9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 및/또는 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도, 또는 이의 특정 범위, 값 또는 분획을 달성하기 위해 임의로 포함할 수 있다.

[0193] 대안적으로, 투여된 용량은 특수 제제의 약력학적 특성, 및 이의 투여 방식 및 경로; 수용자의 연령, 건강, 및 체중; 증상의 특성 및 정도, 현재 치료의 종류, 치료 빈도, 및 요구되는 효과와 같은 공지된 인자들에 따라 변할 수 있다. 일반적으로, 활성 성분의 용량은 체중 kg 당 약 0.1 내지 100밀리그램일 수 있다. 통상적으로 투여당 0.1 내지 50, 및 바람직하게는 0.1 내지 10 밀리그램 또는 지속된 방출 형이 바람직한 결과를 수득하는데 효과적이다.

[0194] 비-제한적 예로서, 사람 또는 동물의 치료는 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 mg/kg 과 같이 0.1 내지 100 mg/kg 의 본 발명의 적어도 하나의 항체의 1회 또는 주기적 용량으로서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40일 중의 적어도 하나, 또는 대안으로 또는 추가로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 또는 52주 중의 적어도 하나, 또는 달리는 또는 추가로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20년 중의 적어도 하나, 또는 이의 어떠한 조합에서 단일, 주입 또는 반복된 투여량을 사용하여 제공될 수 있다.

[0195] 내부 투여에 적합한 용량형(조성물)은 일반적으로 단위 또는 용기당 약 0.1 밀리그램 내지 약 500 밀리그램의 활성 성분을 함유한다. 이러한 약제학적 조성물속에서 활성 성분은 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 약 0.5 내지 99.999중량%의 양으로 주로 존재할 것이다.

비경구 제형 및 투여

[0197] 비경구 투여를 위해, 항체를 액체, 혼탁제, 유제 또는 동결건조된 분산제로서 약제학적으로 허용되는 비경구 비히클과 함께 제형화하거나, 별도로 제공할 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 염수, 링거 용액, 텍스트로즈 용액, 및 1 내지 10% 사람 혈청 알부민이다. 리포좀 및, 고정 오일과 같은 비수성 비히클을 또한 사용할 수 있다. 비히클 또는 동결건조된 산체는 등장성(예를 들면, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성(예를 들면, 완충제 및 방부제)를 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형은 공지되거나 적합한 기술로 멸균시킨다.

[0198] 적합한 약제학적 담체는 당해 분야의 표준 참고 교재인 문헌(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol)의 최신 판에 기술되어 있다.

[0199] 비경구 투여용 제형은 일반적인 부형제로서 멸균수 또는 염수, 폴리알킬렌 글리콜, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 야채 기원의 오일, 수소화된 나프탈렌 등을 함유할 수 있다. 주사용 수성 또는 유성 혼탁제는 적절한 유화

제 또는 습윤제 및 혼탁화제를 사용하여 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 주사용 제제는 무독성의, 비-경구적으로 투여가능한 희석제, 예를 들면, 수성 액제 또는 용매 속의 멸균 주사가능한 액제 또는 혼탁제일 수 있다. 사용가능한 비허를 또는 용매로서, 물, 립거액, 등장성 염수 등이 허용되며; 통상의 용매, 또는 혼탁화 용매로서, 멸균 비휘발성 오일이 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 천연 또는 합성 또는 반합성 지방 오일 또는 지방산; 천연 또는 합성 또는 반합성 모노- 또는 디- 또는 트리-글리세라이드를 포함하는, 어떠한 종류의 비휘발성 오일 및 지방산도 사용할 수 있다. 비경구 투여는 당해 분야에 공지되어 있으며, 통상의 주사 수단, 전문이 본원에 참조로 혼입된, 미국 특허 5,851,198에 기술된 바와 같은 가스 가압된 무침(needle-less) 주사, 및 미국 특허 5,839,446에 기술된 바와 같은 레이저 천공기 장치를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0200] 대안적인 전달

본 발명은 또한, 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복부내, 관절낭내, 연골내, 공동내 (intracavitory), 복내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 자궁경부내, 위장내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심막내, 복강내, 흉강내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 윤활막내, 흉곽내, 자궁내, 방광내, 불내, 자궁, 직장, 불내, 설하, 비강내, 또는 경피 수단에 의한 적어도 하나의 항-CD22 항체의 투여에 관한 것이다. 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물은 비경구(피하, 근육내 또는 정맥내)용 또는 액제 용액제 또는 혼탁제 형태의 어떠한 다른 투여; 질내 또는 크림제 및 좌제와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 투여 특히 반고체 형으로 직장 투여에 사용하기 위해; 정제 또는 캡슐제의 형태와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 불내, 또는 설하 투여용; 또는 산제, 비강 점적제 또는 에어로졸 또는 특정의 제제의 형태와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 비강내로; 또는 젤제, 연고제, 로션제, 혼탁제 또는 폐취 전달 시스템과 같지만, 이에 한정되지 않게 경피적으로 사용하기 위해 제조될 수 있다(상기 공보 및 특허는, 전문이 본원에 참조로 혼입된다. (참조; 미국 특허 제4,309,989호 및 4,767,402호, 당해 문헌들은, 전문이 본원에서 참고로 혼입된다).

[0202] 폐/비강 투여

폐 투여를 위해, 바람직하게는 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물은 폐 또는 부비강의 하부 기도에 도달하기에 효과적인 입자 크기로 전달된다. 본 발명에 따라서, 적어도 하나의 항-CD22 항체를 흡입에 의한 치료제의 투여를 위해 당해 분야에 공지된 각종의 흡입 또는 비강 장치 중의 어느 하나로 전달할 수 있다. 환자의 부비동 또는 폐포내에 에어로졸화된 제형을 침착시킬 수 있는 이들 장치는 계량된 투여량 흡입기, 분무기, 무수 분말 생성기, 스프레이 등을 포함한다. 항체의 폐 또는 비강 투여를 지시하기에 적합한 다른 장치는 또한 당해 분야에 공지되어 있다. 모든 이러한 장치는 에어로졸 속에 항체의 분산을 위한 투여용으로 적합한 제형을 사용할 수 있다. 이러한 에어로졸은 액제(둘다 수성 또는 비수성) 또는 고체 입자로 구성될 수 있다. VentolinTM과 같은 계량된 투여량 흡입기는 전형적으로 추진제 가스를 사용하여 흡인 동안 작동을 필요로 한다(참조; 예를 들면, WO 94/16970, WO 98/35888). TurbuhalerTM(제조원: Astra), RotahalerTM(제조원: Glaxo), DiskusTM(제조원: Glaxo), SpirosTM 흡입기(제조원: Dura), 업자(Inhale Therapeutics)가 시판하는 장치, 및 SpinhalerTM 산제 흡입기(제조원: Fisons)와 같은 무수 분말 흡입기는 혼합된 산제의 흡입-작동(breath-actuation)을 사용한다[참조; 미국 특허 4,668,218(Astra), EP 237507(Astra), WO 97/25086(Glaxo), WO 94/08552(Dura), 미국 특허 5,458,135(Indhaler), WO 94/06498(Fisons), 이들 전문은 본원에 참조로 혼입된다]. AERxTM(제조원: Aradigm), UltraventTM 분무기(제조원: Mallinckrodt), 및 Acorn IITM 분무기(제조원: Marquest Medical Products)(미국 특허 5,404,871(Aradigm), WO 97/22376(상기 문헌들은, 전문이 본원에 참조로 혼입되어 있다)는 용액으로부터 에어로졸을 생산하지만, 계량된 투여량 흡입기, 무수 분말 흡입기 등은 작은 입자 에어로졸을 생성한다. 시판되는 흡입 장치의 이들 구체적인 예는 본 발명의 실시에 적합한 구체적인 장치를 나타내기 위해 의도되며, 본 발명의 영역을 제한함을 의도하지는 않는다. 바람직하게는, 적어도 하나의 항-CD22 항체를 포함하는 조성물은 견조 분말 흡입기 또는 스프레이에 의해 전달된다. 본 발명의 적어도 하나의 항체를 투여하기 위한 흡입 장치의 몇가지 바람직한 특징이 존재한다. 예를 들어, 흡입 장치에 의한 전달은 유리하게 신뢰가능

하고, 재생가능하며, 정밀하다. 흡입 장치는 양호한 호흡능을 위하여 작은 무수 입자, 예를 들면, 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 내지 5 μm 인 입자를 임의로 전달할 수 있다.

[0204] 스프레이로서 CD22 항체 조성물의 투여

CD22 항체 조성물을 포함하는 스프레이이는 적어도 하나의 항-CD22 항체의 혼탁액 또는 용액을 가압하에 노즐을 통해 힘을 가함으로써 생산할 수 있다. 노즐 크기 및 구조, 적용된 압력, 및 액체 공급 속도는 바람직한 결과 및 입자 크기를 달성하기 위해 선택할 수 있다. 전기분무는 예를 들면, 모세관 또는 노즐 공급물과 연결된 전기장에 의해 생산될 수 있다. 유리하게는, 분무기에 의해 전달된 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물의 입자는, 입자 크기가 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm , 및 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm 의 범위이다.

분무기로 사용하기에 적합한 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물 단백질의 제형은 수용액 속에 항체 조성물 단백질을 용액 mL 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg의 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물 단백질, 또는 예를 들면, 0.1, 0.2., 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 mg/mL 또는 mg/gm에 한정되지 않는 이의 어떠한 범위 또는 값의 농도로 전형적으로 포함한다. 제형은 부형제, 완충제, 등장성 제제, 방부제, 표면활성제, 및 바람직하게는 아연과 같은 제제를 포함할 수 있다. 상기 제형은 또한 완충제, 환원제, 덩어리 단백질, 또는 탄수화물과 같은 항체 조성물 단백질의 안정화를 위한 제제 또는 부형제를 포함할 수 있다. 항체 조성물 단백질을 제형화하는데 유용한 덩어리 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 항체 조성물 단백질을 제형화하는데 유용한 전형적인 탄수화물은 슈크로즈, 만니톨, 락토즈, 트레할로즈, 글루코즈 등을 포함한다. 항체 조성물 단백질 제형은 또한 에어로졸을 형성하는데 있어서 용액의 미립자화에 의해 유발된 항체 조성물 단백질의 표면-유도된 응집을 감소시키거나 방지할 수 있는, 표면활성제를 포함할 수 있다. 다양한 통상의 표면활성제, 예를 들면, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 및 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르를 사용할 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 0.001 내지 14 중량%의 범위일 것이다. 본 발명의 목적에 특히 바람직한 표면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. CD22 항체, 또는 명시된 단백질, 또는 변이체와 같은 단백질의 제형을 위한 당해 분야에 공지된 추가의 제제가 또한 제형 속에 포함될 수 있다.

[0207] 네블라이저(nebulizer)에 의한 CD22 항체 조성물 단백질의 투여

항체 조성물 단백질은 제트 네블라이저 또는 초음파 네블라이저와 같은 네블라이저에 의해 투여될 수 있다. 전형적으로, 제트 네블라이저에서, 압착된 공기 공급원을 사용하여 오리피스(orifice)를 통해 고속 공기 제트 (high-velocity air jet)를 생성시킨다. 가스가 노즐 위로 팽창하면, 저-압 영역이 생성되며, 이는 항체 조성물 단백질의 용액을 액체 저장기에 연결된 모세관을 통해 끌어올린다. 모세관튜브로부터의 액체 스트림은, 튜브로 방출되면서 불안정한 필라멘트 및 소적으로 전단되어, 에어로졸을 생성한다. 다양한 구조, 유동 속도, 및 배플 유형(baffle type)을 사용하여 제공된 제트 네블라이저로부터 바람직한 수행 특성을 달성할 수 있다. 초음파 네브라리저에서, 고주파 전기 에너지를 사용하여 압전 변환기를 전형적으로 사용하는 진동의, 기계적 에너지를 생성한다. 당해 에너지는 항체 조성물 단백질의 제형에 직접 또는 커플링 유액을 통해 전송되어, 항체 조성물 단백질을 포함하는 에어로졸을 생성한다. 유리하게는, 네블라이저에 의해 전달된 항체 조성물 단백질의 입자는, 입자 크기가 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm , 및 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm 의 범위이다.

제트 또는 초음파형의, 네블라이저와 함께 사용하기에 적합한 적어도 하나의 항-CD22 항체의 제형은 전형적으로 용액 mL 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg 농도의 적어도 하나의 항-CD22 항체 단백질을 포함한다. 상기 제형은 부형제, 완충제, 등장성 제제, 방부제, 표면활성제, 및, 바람직하게는, 아연과 같은 제제를 포함할 수 있다. 상기 제형은 또한 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물 단백질의 안정화를 위한 제제 또는 부형제, 예를 들면, 완충제, 환원제, 덩어리 단백질, 또는 탄수화물을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물을 제형화하는데 유용한 덩어리 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 적어도 하나의 항-CD22 항체 제형을 제형화하는데 유용한 대표적인 탄수화물은 슈크로즈, 만니톨, 락토즈, 트레할로즈, 글루코즈 등을 포함한다. 적어도 하나의 항-CD22 항체 제형은 표면활성제를 또한 포함할 수 있으며, 이는 에어로졸의 형성시 용액의 분무화에 의해 유발된 적어도 하나의 항-CD22 항체의 표면-유도된 응집을 감소시키거나 예방할 수 있다. 각종의 통상적인 표면활성제, 예를 들면, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탈 지방산 에스테르를 사용할 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 0.001 내지 4 중량%의 범위일 것이다. 본 발명의 목적을 위

해 특히 바람직한 표면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노-올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 항체 단백질과 같은 단백질의 제형화를 위해 당해 분야에 공지된 추가의 제제가 또한 제형 속에 포함될 수 있다.

[0210] 계량된 투여량 흡입기에 의한 CD22 항체 조성물의 투여

계량된 투여량 흡입기(MDI)에서, 추진제, 적어도 하나의 항-CD22 항체, 및 특정의 부형제 또는 다른 첨가제는 캐니스터(canister) 속에 액화압착된 가스를 포함하는 혼합물로서 함유된다. 계량 벨브의 작동은 바람직하게는 약 $1\text{ }\mu\text{m}$ 미만, 바람직하게는 약 $1\text{ }\mu\text{m}$ 내지 약 $5\text{ }\mu\text{m}$, 및 가장 바람직하게는 약 $2\text{ }\mu\text{m}$ 내지 약 $3\text{ }\mu\text{m}$ 의 크기 범위인 입자를 함유하는 에어로졸로서 다이 혼합물(die mixture)을 방출한다. 바람직한 에어로졸 입자 크기는 제트-분쇄, 분무 건조, 임계점 응결을 포함하는, 당해 분야의 숙련가에게 공지된 각종 방법으로 생산된 항체 조성물 단백질의 제형을 사용함으로써 수득할 수 있다. 바람직한 계량된 투여량 흡입제는 3M 또는 Glaxo에 의해 제조되어 하이드로플루오로카본 추진제를 사용하는 것들을 포함한다.

계량된 투여량 흡입기 장치와 함께 사용하기 위한 적어도 하나의 항-CD22 항체의 제형은 예를 들면, 표면활성제의 보조로 추진제 속에 혼탁된 비-수성 매질 속에 혼탁제로서 적어도 하나의 항-CD22 항체를 함유하는 미분된 분말을 일반적으로 포함할 것이다. 추진제는 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본, 또는 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, HFA-134a(하이드로플루오로알칸-134a), HFA-227(하이드로플루오로알칸-227) 등을 포함하는 탄화수소와 같이, 당해 목적을 위해 사용된 특정의 통상적인 물질일 수 있다. 바람직하게는, 추진제는 하이드로플루오로카본이다. 표면활성제는 추진제 속의 혼탁제로서 적어도 하나의 항-CD22 항체를 안정화시키고, 화학적 분해에 대해 활성제를 보호하기 위해 선택될 수 있다. 적합한 표면활성제는 소르비탄 트리올레이트, 대두레시틴, 올레산 등을 포함한다. 일부 경우에 용액 에어로졸은 에탄올과 같은 용매를 사용하는 것이 바람직하다. 단백질의 제형을 위해 당해 분야에 공지된 추가의 제제가 또한 상기 제형 속에 포함될 수 있다.

당해 분야의 숙련가는, 본 발명의 방법이 본원에 기술되지 않은 장치를 통해 적어도 하나의 항-CD22 항체 조성물의 폐 투여에 의해 달성될 수 있음을 인식할 것이다.

[0214] 경구 제형 및 투여

경구 투여용 제형은 장 벽(intestinal wall)의 투과성을 인공적으로 증가시키기 위한 보조제(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 올레이일 에테르 및 n-헥사데실폴리에틸렌 에테르와 같은 레조르시놀 및 비이온성 표면활성제)의 동시-투여, 및 또한 효소 분해를 억제하기 위한 효소 억제제(예를 들면, 췌장 트립신 억제제, 디이소프로필플루오로포스페이트(DFF) 및 트라실룰)의 동시-투여에 의존한다. 경구 투여용의 고체-형 용량형의 활성 성분 화합물은 슈크로즈, 락토즈, 셀룰로즈, 만니톨, 트레할로즈, 라피노즈, 말티톨, 텍스트란, 전분, 아가, 아르기네이트, 키틴, 키토산, 펩틴, 겸 트라가칸트, 겸 아라비, 젤라틴, 콜라겐, 카제인, 알부민, 합성 또는 반합성 중합체, 및 글리세라이드를 포함하는 적어도 하나의 첨가제와 혼합될 수 있다. 이들 용량형은 또한 다른 유형(들)의 첨가제, 예를 들면, 불활성 희석제, 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 파라벤, 소르브산, 아스코르브산, 알파-토코페롤과 같은 방부제, 시스테인과 같은 항산화제, 봉해제, 결합제, 증점제, 완충제, 감미제, 풍미제, 향미제 등을 함유할 수 있다.

정제 및 필제(pill)는 장-피복된 제제로 추가로 가공할 수 있다. 경구 투여용의 액체 제제는 의학적 용도로 허용가능한 유제, 시럽제, 엘리서르제, 혼탁제 및 용액 제제를 포함한다. 이들 제제는 상기 분야에서 통상적으로 사용된 불활성 희석제, 예를 들면, 물을 함유할 수 있다. 리포좀은 또한 인슐린 및 혼합된 아미노산의 인공 중합체(프로테이노이드)의 미세구를 사용하여 약제를 전달하여 왔다(참조: 미국 특허 4,239,754). 보다 최근에, 혼합된 아미노산의 인공 중합체(프로테이노이드)의 미세구를 사용하여 약제를 전달하여 왔다(참조: 미국 특허 4,925,673). 또한, 미국 특허 제5,879,681호 및 미국 특허 5,871,753에 기술된 담체 화합물을 사용하여 당해 분야에 공지된 경구적으로 생물학적 활성인 제제를 전달한다.

[0217] 점막 제형 및 투여

점막 표면을 통한 흡수를 위해, 적어도 하나의 항-CD22 항체를 투여하는 조성물 및 방법은 다수의 서브마이크론 입자, 점막부착 거대분자, 생활성 웨პ타이드, 및 유액 입자의 점막부착을 달성함으로써 점막 표면을 통해 흡수를 촉진하는 수성 연속 상을 포함하는 유액을 포함한다(참조: 미국 특허 제5,514,670호). 본 발명의 유액의 적용에 적합한 점막 표면은 각막, 결막, 볼내, 설하, 비강, 질내, 폐, 위장, 장 및 직장 투여 경로를 포함할 수 있다. 질 또는 직장 투여용 제형, 예를 들어, 좌제는 부형제로서, 예를 들면, 폴리알킬렌글리콜, 바셀린, 코코아-

버터 등을 함유할 수 있다. 비강내 투여용 제형은 고체일 수 있으며 부형제로서, 예를 들면, 락토즈를 함유하거나 비강 점점의 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 불내 투여용 부형제는 당, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 예비겔라틴화된 전분 등을 포함한다(참조: 미국 특허 5,849,695).

[0219] 경피 제형 및 투여

경피 투여를 위해, 적어도 하나의 항-CD22 항체를 리포좀 또는 중합체성 나노입자, 미세입자, 미세캡슐, 또는 미세구(달리 기술되지 않는 한 미세입자로서 총칭하여 언급됨)와 같은 전달 장치 속에 봉입된다. 폴라락트산, 폴리글리콜산 및 이의 공중합체와 같은 폴리하이드록시산, 폴리오르토에스테르, 다무수물 및 폴리포스파젠과 같은 합성 중합체, 및 콜라겐, 폴미아미노산, 알부민 및 다른 단백질과 같은 천연 중합체, 알기네이트 및 다른 다당류, 및 이의 조합으로 제조된 미세입자를 포함하는 다수의 적합한 장치가 공지되어 있다(참조: 미국 특허 5,814,599).

[0221] 연장된 투여 및 제형

본 발명의 화합물을 연장된 기간에 걸쳐, 예를 들면 단일 투여로부터 1주 내지 1년의 기간 동안 대상체에게 전달하는 것이 때때로 바람직할 수 있다. 다양한 서방성, 데포트(depot) 또는 이식 용량형이 이용될 수 있다. 예를 들면, 용량형은 체액 속에서 낮은 정도의 용해도를 가진 화합물의 약제학적으로 허용되는 무독성인 염, 예를 들면, (a) 인산, 황산, 시트르산, 타르타르산, 탄닌산, 파모인산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌 모노- 또는 디-설폰산, 폴리갈락투론산 등과 같은 다염기성 산과의 산 부가염; (b) 아연, 칼슘, 미스무쓰, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 구리, 코발트, 니켈, 카드뮴 등과 같은 다가 금속 양이온, 또는 예를 들면, N,N'-디벤질-에틸렌 디아민 또는 에틸렌디아민으로부터 형성된 유기 양이온과의 염; 또는 (c) (a)와 (b)의 조합, 예를 들면, 아연 탄네이트 염을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물 또는, 바람직하게는 바로 기술된 것들과 같은 비교적 불용성인 염은 겔, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 겔 속에서 예를 들면, 주사에 적합한 참깨 오일과 함께 제형화될 수 있다. 특히 바람직한 염은 아연 염, 아연 탄네이트 염, 파모에이트 염 등이다. 주사용의 서방성 데포트 제형(slow release depot formulation)의 다른 유형은 예를 들면, 미국 특허 3,773,919에 기술된 바와 같은 폴리락트산/폴리글리콜산 중합체와 같은 서서히 봉해되는, 무독성의 비-항원성 중합체 속에 봉입시키기 위해 분산된 화합물 또는 염을 함유할 수 있다. 화합물 또는 바람직하게는, 위에 기술된 것들과 같은 비교적 불용성인 염이 또한, 특히 동물에서 사용하기 위해 콜레스테롤 매트릭스 실라스틱 펠렛 속에서 제형화될 수 있다. 추가의 서방성, 데포트 또는 이식 제형, 예를 들어, 가스 또는 액체 리포좀은 문현(참조: 미국 특허 5,770,222 및 "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978)에 공지되어 있다.

[0223] 약어:

[0224] BSA-소 혈청 알부민

[0225] EIA-효소 면역검정

[0226] FBS-태아 송아지 혈청

[0227] H₂O₂-과산화수소

[0228] HRP-서양고추냉이 퍼옥시다제

[0229] Ig-면역글로불린

[0230] CD22-ICD22

[0231] IP-복강내

[0232] IV-정맥내

[0233] Mab-모노클로날 항체

[0234] OD-광학 밀도

[0235] OPD-o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드

[0236] PEG-폴리에틸렌 글리콜

[0237] PSA-페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신

[0238] RT-실온

[0239] SQ-피하

[0240] v/v-용적당 용적

[0241] w/v-용적당 중량

실시예 1. 친화성 및 정량화 ELISA.

[0243] Nunc-Immuno MaxiSorp 96 웰 플레이트(well plate)를 피복 용액(PBS중 중탄산나트륨) 중의 $100 \mu\text{l}$ 의 $2\mu\text{g}/\text{ml}$, $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$, $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 $0.002\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 재조합체 CD22 세포외 도메인(제조원: PeproTech, Inc. 제품 번호 100-01)으로 피복하였다. 플레이트를 플레이트 밀봉기로 덮고 4°C 에서 밤새 항온처리하였다. 플레이트를 비우고 잔류하는 액체를 종이 타월 위에서 두들겨 제거하였다. $200 \mu\text{l}$ 의 세척 용액(PBS 중 0.05% 트윈-20)을 가하고 200 RPM에서 5분 동안 실온에서 진탕시켰다. 플레이트를 비우고 잔류하는 액체를 종이 타월 위에서 두들겨 제거하였다. $200 \mu\text{l}$ 의 차단 용액(PBS중 2% 카네이션 우유(Carnation milk))을 가하고 200 RPM에서 1시간 동안 실온에서 진탕시켰다. 플레이트를 비우고 잔류하는 액체를 종이 타월 위에서 두들겨 제거하였다. ELISA를 위한 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015 항체를 함유하는 $100 \mu\text{l}$ 의 희석된 시료를 사용하였다. 시료를 200 RPM에서 1시간 동안 실온에서 진탕시키고; 플레이트를 비우고 잔류하는 액체를 종이 타월 위에서 두들겨 제거하였다. $200 \mu\text{l}$ 의 세척 용액(PBS중 0.05% 트윈-20)을 가하고, 200RPM에서 5분 동안 실온에서 진탕시키고; 플레이트를 비우고 잔류하는 액체를 종이 타월 위에서 두들겨 제거하였다. 당해 공정을 3회 반복하였다. 차단 용액(PBS중 2% 카네이션 우유) 속에 희석시킨 HRP와 접합된 $100 \mu\text{l}$ 의 1:2500 희석의 항-사람 IgG를 모든 시료용으로 가하였다. 차단 용액(PBS중 2% 카네이션 우유) 속에 희석시킨 HRP와 접합된 $100 \mu\text{l}$ 의 1:2500 희석의 항-토끼 IgG를 대조군 항체용으로 가하였다. 내용물들을 200RPM에서 1시간 동안 실온에서 진탕시키고, 플레이트를 비우고 잔류 액체를 종이 타월 위에서 두들겨 제거하였다. $200 \mu\text{l}$ 의 세척 용액(PBS중 0.05% 트윈-20)을 가하고, 200RPM에서 5분 동안 실온에서 진탕시키고; 플레이트를 비우고 잔류하는 액체를 종이 타월 위에서 두들겨 제거하였다. 당해 공정을 3회 반복하였다. $100 \mu\text{l}$ 의 TMB 기질 용액을 가하고, 실온에서 항온처리하였다. 반응을 1N HCl로 중지시키고, 플레이트를 450nm에서 판독하여 상대적인 결합 친화성을 측정하였다(도 17).

정량화 ELISA

실시예 2. CHO-S 세포 형질감염

[0246] 형질감염 1주일 전에, CHO-S 세포(제조원: Invitrogen)를 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium: D-MEM)(제조원: Invitrogen) 속에서 단층 배양물로 이전시켰다. 형질감염 1일 전에, 세포를 형질감염 시료 당 $100 \mu\text{L}$ 의 혈청이 보충된 D-MEM 중 0.4×10^5 의 세포로 96웰 양식으로 플레이팅한다. 각각의 형질감염 시료에 대해 DNA-리포펙타민 복합체를 제조하였다. $25 \mu\text{L}$ 의 Opti-MEM 환원된 혈청 매질 속에 $0.25\mu\text{g}$ 의 DNA를 희석시키고 온화하게 혼합하고, 실온에서 5분 동안 항온처리하였다. $25 \mu\text{L}$ 의 Opti-MEM 환원된 혈청 매질 속에서 $0.5 \mu\text{L}$ 의 리포펙타민 2000(제조원: Invitrogen)을 희석시켰다. 온화하게 혼합하고 실온에서 5분 동안 항온처리하였다. 희석된 DNA를 희석된 리포펙타민과 합하였다. 온화하게 혼합하고 20분 동안 실온에서 항온처리하였다. $50 \mu\text{L}$ DNA-리포펙타민 복합체를 세포 및 배지를 함유하는 각각의 웰에 가하였다. 플레이트를 흔들어 온화하게 혼합하였다. 세포를 37°C 에서 $5\% \text{CO}_2$ 항온처리기 속에서 밤새 항온처리하였다. 각각의 웰 속에 배지를 통기하였다. $100 \mu\text{L}$ 의 혈청 보충된 D-MEM을 각각의 웰에 가하였다. ELISA 검정을 위해 상층액을 및 베타-갈락토시다제 검정을 위해 세포 분해물을 수집하였다.

실시예 3. 세포 배양 상층액으로부터 항체 정제

[0248] 다음의 완충제를 표준 양식으로 제조하였다. 결합 완충제 $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0. 용출 완충제: 12.5 mM 시트르산, pH 2.7(Na_3 -시트레이트 사용). 중화 완충제: $0.5 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8.0. 20% 에탄올 및 물. 모든 완충제를 사용 전에 여과하였다($0.45 \mu\text{m}$). 상층액을 HiTrapTM 단백질 G 세파로즈 HP(1mL 용적) 컬럼이 맞춰진 AKTATM FPLCTM 시스템을 사용하여 정제하였다. 시료 로딩을 위해, 로딩 투브를 에탄올(20 mL , $5 \text{ mL}/\text{분}$)로 세정한 후, 결합 완충제(20 mL , $5 \text{ mL}/\text{분}$)로 세정하였다. 단백질 G 컬럼을 시스템에 부착시키고 결합 완충제

(10 mL, 1 mL/mn)로 세정하였다. 시료를 1 mL/분 또는 보다 느리게(밤새 로딩을 위해) 로딩하였다. 로딩 후, 컬럼을 탈착시키고 로딩 투브를 물(20 mL, 5 mL/mn)로 세정한 후 20% 에탄올(20 mL, 5 mL/분)로 세정하였다. 항체 정제를 위해, AKTA 시스템을 결합 완충제로 세척(펌프 A 및 모든 투빙)하였다. 수집 투브를 50 μ L 중화 완충제를 각각의 투브에 가하여 분획 수집용으로 제조하였다. 단백질 G 컬럼을 시스템에 부착시켰다. 유동을 1 mL/분으로 설정하고, 기본선이 안정될 때까지 이동시켰다. 컬럼 벨브를 3번 위치로 스위칭하였다. 컬럼을 결합 완충제(최소 10 mL)로 기본선에 도달할 때까지 세척하였다. 펌프를 중지시키고 물로 세척한 후, 용출 완충제로 세척하였다. 유동을 1 mL/분으로 설정하고, 기본선이 안정될 때까지 이동시켰다. 컬럼 벨브를 3번 위치로 스위칭하고 분획 수집기를 시동시켰다(0.5 mL의 분획). 시스템이 중지되는 지점에 기본선이 도달할 때까지 분획을 수집하였다. 용출 프로파일을 클립보드(clipboard)로 및 WORD 문서로 복사하였다. 펌프를 물로 세척한 후; 결합 완충제로 세척하였다. 단백질 G 컬럼을 결합 완충제(10 mL)로 세척하였다. 펌프를 20% 에탄올로 세척하였다. 컬럼을 냉방에 저장한 20% 에탄올(20 mL)로 세척하였다.

[0249] 항체를 멸균 1X PBS, pH 7.4, 0.02% 나트륨 아지드, 10 mg/mL BSA 속에서 재구성하였다. 항원은 0.5 mg, 1 mg, 0.5 mg 및 0.5 mg에서 4개의 별도의 바이알 속의 CD22(21,000 kDa)이었고, 멸균 1X PBS, pH 7.4, 0.02% 나트륨 아지드로 375 μ g/mL, 1 mg/mL, 500 μ g/mL 및 500 μ g/mL까지 희석시켰다. 표지, Cy5-접합된 아피니퓨어(AffiniPure) 염소 항-사람 IgG(H+L), Cy5, 1.5 μ g/mL는 업자(Jackson ImmunoResearch, 펜실바니아주 웨스트그로브 소재)로부터 구입하였다. 표지를 멸균 1X PBS, pH 7.4, 0.02% 나트륨 아지드 속에 재구성하고 0.500 mg/mL로 희석하였다. 이동 완충제는 1X PBS, pH 7.4, 0.02% 나트륨 아지드이었다. 시료 완충제는 1X PBS, pH 7.4, 0.02% 나트륨 아지드, 1 mg/mL의 소 혈청 알부민(BSA)이었다. PMMA 비드(Part# 440197/Lot3257)는 업자[Sapidyne Instruments, Inc.(인디애나주 보이세 소재)]에 의해 제공되었으며 다음의 양식으로 포획 시약으로 꾸며졌다. 비드를 200 mg 부위로 분취하여 건조시키고 1 mL의 피복 용액(이동 완충제 중 30 μ g/mL BAP001) 속에서 2시간 동안 흔들었다. 이후에, 비드를 차단 용액(이동 완충액 중 10 mg/mL BSA) 속에서 1시간 동안 흔들고 4°C에서 저장하였다.

[0250] 평형 분석을 위하여, CD22로 피복된 PMMA 비드를 사용하여 수용체(항-CD22 항체) 및 리간드(항원; CD22)의 평형화된 시료로부터의 유리 수용체(free receptor)의 부위를 포획하였다. 각각의 데이터 점을 위해, 리간드-피복된 비드의 새로운 컬럼을 유동 세포내로 도입하였다. 평형화된 시료를 컬럼 뒤로 신속하게 제거하여 고정된 리간드와의 접촉 시간을 최소화하였다. 고정된 리간드와의 이러한 보장된 접촉 시간은 시료 평형을 파괴하지 않는다. 따라서, 고정된 리간드는 프로브(probe)로서 작용하여 용액 속의 유리 수용체를 포획하였다. 포획된 항체를 형광적으로 표지된 항-사람 제2 항체를 사용하여 검출하였다. 결합하지 않은 시약을 세척 제거하여, 평형화된 시료 속에 유리 수용체에 대해 비례하는 시그널(signal)을 남겼다. 형광성은 평형화된 시료 속에서 유리 수용체(항체)의 양에 직접 비례하는 전압으로 전환시켰다. 실험을 고 농도 및 저 농도의 수용체에서 수행한 후 최적의 결과를 위해 n-곡선 분석에서 함께 이용하였다. 역학적 분석의 직접적인 방법을 위해, 동일한 고정된 리간드(PMMA로 피복된 CD22)를 평형 실험에 대한 역학적 실험에 대한 포획 시약으로서 사용하였다. 시료 속의 유리 수용체(항체)의 양은 평형-전에 측정하여, 시료가 평형을 향해 이동하는 시간에 걸쳐 유리 수용체(항체) 속에서의 감소를 모니터링하는 데이터 점을 생성하였다. 도 33은 BA003(CNT0136)과 비교하여 항-IL6 항체 BAP001-클론 1 내지 BAP001-클론 10에 대한 상위 10개 히트의 사피다인 분석(Sapidyne analysis)으로부터 얻은 데이터를 포함한 표를 나타낸다.

[0251] **실시예 4. 본 발명의 항-CD22 항체의 재조합체 CD22 세포의 도메인에 대한 친화성 상수의 표면 폴라스몬 공명 측정**

[0252] BIACore 3000(제조원: GE Healthcare)를 사용하여 결합 곡선 및 역학적 매개변수를 측정하였다. 항-사람 Fc(1.8 mg/mL)를 NaOAc 완충제(10 mM, pH 4.8) 속에서 50 μ g/mL의 농도로 희석시키고 BIACore 시스템 매뉴얼에 기술된 바와 같이 제조업자의 아민-커플링 화학을 사용하여 CM-5 센서 칩의 카복시메틸화된 텍스트란 매트릭스에 커플링시켰다. 10000RU를 목적으로 하는 표면 제조 위자드(wizard)를 사용하여, 센서 표면상의 카복실 그룹을 우선 NHS/EDC에 이어서 항-사람 Fc의 첨가로 활성화시켰다. 나머지 활성화된 그룹을 1M 에탄올아민을 주사하여 차단시켰다. 유동 세포 각각을 개별적으로 커플링시켰다. 이를 조건을 사용하여, 7554-9571 RU의 항-사람 Fc를 함유하는 4개의 유동 세포 표면을 제조하였다. 예비 실험에서, 3개의 주사(30 μ L/분에서 15 μ L) 100 mM H₃PO₄/0.05% CHAPS는 결합된 면역글로불린을 효율적으로 제거하여 고정된 항-사람 Fc의 결합능을 보존할 수 있는 것으로 측정되었다.

[0253] 실험을 BIACore 3000 위에서 25°C 및 30 μ L/분의 유동 속도에서 수행하였다. 항체 후보물을 5 μ g/mL에서

HBS(0.15M NaCl, 3.4 mM EDTA, 및 0.05% 표면활성제 P20가 pH 7.4에서 들어있는 10 mM HEPES)속에 용해하였다. 분석물, CD22를 HBS 속에 0.25, 0.125, 0.062, 0.031 및 0.015 μ g/ml에서 용해하였다. 3*30 μ l의 5 μ g/ml의 항체 BA001을 이의 각각의 유동 세포 위에서 240 μ l의 각각의 CD22 농도를 30 μ l/분(해리 상) 및 차단되지 않은 1200초의 완충제 유동(해리 상)을 주입한 후 유동시켰다. 칩의 표면을 100 mM H₃PO₄/0.05% CHAPS를 사용하여 각각 15 μ l의 3회 연속적인 주입으로 재생시켰다. HBS의 주입은 분석을 위한 대량의 쿨절률을 감하기 위한 참조(블랭크 센소그램(blank sensogram))으로서 제공한다. BIAevaluation 4.1 속에서 1:1 모델을 사용하여, 국소 풋(local fit) 및 공통의 풋(global fit)을 해리(kd, [s-1] 및 연합(ka, [M⁻¹V⁻¹]) 및 계산된(kd/ka) 해리 상수(KD, [M]) 둘 다에 대해 수행하였다.

[0254] 분석을 BIAevaluation 버전 3.0을 사용하여 수행하였다. 역학적 상수는 실험 곡선을 상호작용 메카니즘의 모델로부터 기원한 속도 방정식에 실험 곡선을 풋팅함으로써 센소그램 데이터(sensogram data)로부터 유도하였다 국소 R_{Umax} 풋트, ka, kd, 및 KD를 사용한 1:1 결합 모델을 사용하는 공통 분석을 측정하였다.

[0255] 다음의 방정식을 이용하였다:



$$[AbAg] = 1$$

$$K_a = \frac{[Ab][Ag]}{[AbAg]} = \frac{1}{[Ab][Ag]}$$

$$[0259] \quad [Ab][Ag] \quad K_d$$

[0260] 친화성 성숙 전에 사람화된 항-CD22 모노클로날 항체에 대한 BIACORD 데이터를 표 18에 설정한다(BA006G). BA600G 친화성 성숙 및 후속적인 사람화 후 선택된 클론을 도 18에 나타낸 바와 같이 Biacore 분석으로 시험하였다.

[0261] 실시예 5. 항-CD22 선택된 항-CD22 항체는 림프종 세포주 속에서 발현된 세포 표면 CD22에 결합하여 내부화를 유도한다.

[0262] CD22 단백질은 Daudi, RAMOS 및 RAJI B 세포주를 포함하는 발달하는 B 세포 및 대부분의 사람 비-호지킨 림프종 세포주 속에서 발현되는 것으로 밝혀졌다(참조: Knowles D. M., Chadburn A., Inghirami G. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms Knowles D. M. eds. . Neoplastic Hematopathology, 73-95, Williams & Wilkins Baltimore 1992). B 세포주에 대한 항-CD22 항체의 결합, 또는 건강한 개인 및 비-호지킨 림프종(NHL)을 지닌 환자로부터의 주요 B 세포의 결합은 CD22/항체 복합체의 신속한 내부화를 생성한다. 내부화는 주요 B 세포 및 NHL 환자-기원한 B 세포보다 세포주 내에서 조기 시점에 더 빠른 것으로 나타나지만, 도달된 최대 내부화는 처리한지 수시간 후 모든 B 세포 집단에 대해 비교가능하며 보다 높은 항체 농도에서 포화에 도달하는 것으로 나타난다.

[0263] 본원에 선택된 항-CD22 모노클로날 항체, 본 발명의 클론 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015를 형광성 활성화된 세포 분류 분석에 의해 측정된 것으로서 Daudi, RAMOS 및 RAJI B 림프종 세포주에서 세포 표면 발현된 CD22에 결합하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 분석 전에 세포 배양을 10: \% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 매질 속에서 대수 성장으로 유지시켰다. 항-CD22 발현 수준을 ELISA 및 FACS 분석에 의해 피코에리트린(PE)(제조원: Becton Dickinson, 제품 번호 340708)에 접합된 시판되는 항-CD22 항체를 사용하여 ELISA 및 FACS 분석으로 측정하였다. 기본선 표면 발현을 위해, 1 X 10e6 Daudi 세포(예를 들면)를 2% FBS 및 12 μ g/ μ l의 항-CD22-PE 접합체를 함유하는 PBS와 함께 45분 동안 냉장에서 항온처리한 후 냉-냉각된 PBS-FBS 용액으로 세척하였다. 이후에, 세포를 표준 과정을 사용하여 FACS로 분석함으로써 표적 세포 집단내 표면 결합을 정량화하였다.

[0264] 동시에, Daudi 세포, 1 X 10e6을 유사한 농도의 본 발명의 선택된 항-CD22 Mab 클론, VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015로 PBS-FBS 용액 속에서 20시간 동안 37°C에서 처리하여 결합 및 내부화되도록 하였다. 당해 기간 후에, 세포를 세척한 후, 냉장에서 PBS-FBS 용액중 12 μ g/ml 항-CD22-PE 접합체에 노출시켰다. 당해 조건하에서, 잔류 성의 표면 CD22는 위에서 기술된 바와 같이 FACS 분석을 사용하여 검출하고 정량화할 수 있다. 본 발명의 항-

CD22 항체에 대한 대표적인 결과는 도 19a에 나타낸다. 20시간 동안 노출시킨 후 보다 낮은 수준의 검출을 나타내는 형광성 집단에 있어서 좌측으로의 이동으로 측정되는 바와 같이 표면 CD22 발현에 있어서 감소가 있다. 상대적인 양의 CD22 표면 발현의 감소는 2개의 집단의 비로 나타낼 수 있다.

[0265] 37°C에서 20시간 동안 노출 전 및, 노출 후 항-CD22-PE 접합체 결합에 있어서 이동 퍼센트로 측정시 CD22 수용체를 내부화하는 이들의 능력에 대한 항-CD22 항체의 패널의 평가 결과를 도 19b에 나타낸다. CD22 발현에 있어서 변화 스펙트럼은 CD22 양성 집단에 있어서 좌측으로의 이동으로 가시된 바와 같이 측정한다. 내부화 정도의 정량화를 도 20의 경우 나타낸다. 본 발명의 개개의 항-CD22 클론 선택된 항-CD22 Mab 클론 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015을 위에서 기술한 바와 같이 분석하고, CD22 내부화의 상대적인 정도를 항체 노출 후 기본선에 걸쳐서 집단에 이동 퍼센트로 나타내었다.

[0266] **실시예 6. 림프종 세포주에서 정량적 공총점 면역형광성 현미경에 의한 본 발명의 항-CD22 항체의 신속한 내부화의 측정**

[0267] Daudi 세포를 37°C에서 10% FBA를 함유하는 RPMI 1640 배지 속에서 대수적 성장의 조건하에 유지시킨 다음, 분석을 위해 수거하였다. 본 발명의 선택된 항-CD22 선택된 항-CD22 Mab 클론 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015를 제논 표지화 복합체(제조원: Molecular Probes)를 사용하여 제조업자의 추천된 과정을 사용하여 FTTC에 직접 접합시켰다. 대략 1 X 10e7개의 Daudi 세포를 5 µg/ml의 표지된 항-CD22 항체를 함유하는 PBS 속에 재현탁시키고 45분 동안 빙상에서 항온처리하였다. 이후에 세포를 PBS-FBS 용액 속에서 0°C에서 2회 세척하였다. 이후에, 세포를 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지 속에서 다양한 기간 동안 37°C에서 항온처리하고 수거하고 PBS 속에서 0°C에서 세척하였다. 이후에, 세포를 4% 파라포름알데하이드 용액 속에 5분 동안 실온에서 간단하게 고정시킨 후, 0.05% 트리톤 X-100을 함유하는 PBS 속에서 세척하였다. 세포 펠렛(pellet)을 원심분리로 수집하고 최소 용적의 FBS 닉트(FBS neat) 속에 재현탁시킨 후, 유리 현미경 슬라이드에 적용하였다. 분석 전에, 슬라이드를 핵 염색 DAPI를 함유하는 탑재 유액으로 처리한 후, 커버슬립(coverslip)을 적용하였다. 공총점 영상을 ACAS Ultima 공총점 현미경(제조원: Meridian Instruments, Inc., 미주리주 오케모스 소재)을 사용하여 기록하고 100x 오일 침지 대물렌즈를 사용하여 촛점 평면의 중심을 통해 1-µm 단면을 나타낸다.

[0268] 본 발명의 항-CD22 모노클로날 항체 선택된 클론 VM 1000, VM 1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015를 세포 표면상의 면역형광성 시그널 대 세포내 이입 구획(intracellular endocytotic compartment)으로 판단한 것으로서 세포내 구획내로 신속하게 내부화하는 이들의 능력을 분석하였다. 본 발명의 항체를 BA006H, 및 쥐 모노클로날 항체 LL2의 사람화된 버전과 비교하였다. 당해 실시예, 도 21a에서, 본 발명의 항-CD22 항체는 상대적인 평균 형광성(RMF)에 의해 판단된 것으로서 BA006H와 비교하여 대략 20-배까지 Daudi 세포의 표면 상에 발현된 CD22 단백질에 결합하며, 90분내에 세포내에서 실제적으로 완전히 내부화하여, 핵주변 골지체 장치 및 관련된 라이소좀내에 주로 국재화한다. 본 발명의 개개의 항-CD22 항체에 대해 당해 방식으로 수득된 RMF 표면 결합 값의 차트를 도 21b에 나타낸다.

[0269] **실시예 7. CD22 양성 림프종 세포주 항-CD22 모노클로날 항체의 처리 후 CD22 타이로신 인산화의 자극은 본 발명의 클론 VM1000, VM1001, VM1002, VM1003, VM1004, VM1005, VM1006, VM1007, VM1008, VM1009, VM1010, VM1011, VM1012, VM1013, VM1014, 및 VM1015를 선택하였다. 항-CD22 항체는 CD22를 발현하는 세포에 결합하여 이들의 수용체의 세포질성 영역의 타이로신 인산화를 자극하는 것으로 이미 밝혀져 있다(참조: Carnahan et al, Clin Cancer Res September 1, 2003 9; 3982s). 항-CD22 항체의 이러한 생활성은 BCR 시그널링 복합체의 부정적 조절과 관련되어 감소된 림프종 세포 성장 및 세포 사멸의 유도를 생성한다. 따라서, 선택된 항-CD22 항체를 수용체를 발현하는 세포주에 대한 노출 시 CD22 타이로신 인산화를 자극하는 이들의 능력에 대해 분석하였다. Daudi 세포는 수거 전 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 속에서 배양하고 항-CD22 항체로 처리함으로써 대수 성장기로 유지시켰다. 이후에, 처리된 세포를 분해 완충제로 분해하고 CD22를 항-CD22 BA006H를 사용하여 면역침전시킨 후 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로트 분석(Western blot analysis)에 적용시켰다. 이후에, 수득되는 블로트를 항-포스포타이로신 항체(4G10) 또는 토끼 모노클로날 항-CD22(제조원: Santa Cruz, 제품 번호 SC-7932)로 프로브하였다. 도 22a 및 b는 이를 분석의 결과를 나타낸다. 총 CD22에 대한 타이로신 인산화된 CD22 단백질이 비율은 하기의 각각의 항체 처리를 나타낸다. 대조군으로서, Daudi 세포를 항-IgM 항체로 처리하여 B-세포 수용체 복합체를 CD22 세포질성 도메인을 경-인산화하기 위한 잠재능을 채우는 수단으로서 관여시켜 자**

극하였다.

실시예 8. 교차 반응성

[0270] 표면 단백질 CD22는 발달하는 B-세포 및, B-세포 계통으로부터 기원한 림프종 및 백혈병 세포의 표면에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 항-CD22 항체를 쥐 및 설치류 B-세포에서 발현된 CD22와 교차-반응하는 능력에 대해 평가하였다. 결과는, 단백질의 설치류 형태에 대한 허용가능한 결합이 존재함을 나타낸다. 본 발명의 항-CD22 항체를 또한 영장류 종, 시노몰구스 마카크(cynomologus macaques)[마카카 파스키큘라이스(Macaca fascicularis)]에 대한 교차 반응성에 대해 평가하였다. 시노몰구스 마카크(제조원: source Primate Biologicals, Inc., 메릴랜드주 베테스다 소재)(CD22 양성 B-세포에 대해 농축됨)로부터 분리된 말초 혈액 림프구(PBMC)를 분석하였다. 본 발명의 항-CD22 항체(본원의 데이터에서 "VM101"로서 지정된 항-CD22 항체)를 형광성 분자 피코에리트린(PE)으로 직접 표지하였다. 양성 염색을 시험하기 위해, 각각의 시험 조건에 대해 대략 2.5×10^6 PBMC를 PBS로 세척한 후 10% 태아 송아지 혈청(FBS)을 함유하는 PBS 속에 재현탁시켰다. 이후에, 세포를 항체가 없거나, 항-CD22 PE-표지된 항체($20\mu\text{g}/\text{ml}$), 또는 시노몰구스와 교차-반응하는 것으로 밝혀진 항-사람 CD20-FITC 접합된 항체(제조원: Miltenyl Biotech, 제품 번호 130-091-108, 스톡 용액의 1 : 10 회석에서)에 노출시킨 후, 0°C 에서 60분 동안 항온처리하였다. 각각의 시험 조건을 위해 세포를 PBS 속에서 세척한 후 PBS 중 4% 파라포름알데하이드로 실온에서 10분 동안 고정시켰다. 이후에, 세포를 0.5 ml의 2% FBS를 함유하는 PBS 속에 재현탁시킨 후 형광성 활성화된 세포 분류(FACS) 분석(도 1)에 의한 CD22 및 CD20 표면 염색에 대해 분석하였다. 항체로 처리하지 않은 세포는 FITC 또는 PE 채널에서 형광성 강도에 있어 주목할만한 이동을 가지지 않았지만(도 1a), VM101-PE로 염색된 세포는 CD22 양성 집단을 함유하였다(도 1b). 유사하게, 항-CD20-FITC로 염색한 세포는 CD20 양성 집단을 함유하였다(도 1c). VM101-PE 및 CD20-FITC 항체 둘 다로 염색한 세포는 PBMC 속에서 항원 둘다의 발현 양식을 기본으로 예측할 수 있는 바와 같이 이중 표지된 집단을 갖는다(도 1d). VM101은 시노몰구스 CD22 단백질을 구체적으로 인식한다.

실시예 9. 항-CD22 항체의 상대적인 발현.

[0272] [0273] 본 발명의 항-CD22 항체를 포유동물 세포 속에서 발현시켜 이들이 임상 연구용 물질을 생산하기 위한 제조 공정에서 고 수준의 생산과 일치하는 특성을 갖는지를 측정하였다. 본 발명의 항-CD22 항체(항체 1, 항체 2 및 항체 3)의 발현을 대조군 항체("대조군"), 사람화된 CD22 항체와 비교하였다. 각각의 CD22 항체를 발현하는 수득되는 세포를 포유동물 세포 배양 조건에서 동일한 기간 동안 배양하고 조건화된 배지를 모노클로날 항체의 존재 및 수율에 대해 시험하였다. 결과를 이들 조건 동안 고 수준에서 발현하는 시판된 항체(트라스투주마브, 또한 헤레셉틴으로 공지됨)와 비교하여 비교인자로 제공한다. 표 1은 이들 조건하에서의 발현 및 제조능에 대한 당해 시험의 결과를 나타낸다.

도면

도면1

SEQ ID NO:1
VM1000 LC
GAAATITGTGTGACACAGICTCCAGCCACCCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCC
TGCAAGTCCAGTCAAAGTGTGTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCCTGGTATCAGCA
GAAACCGGGAAAGCTCTAAGCTCTGATCTATTGGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGGGTCCCAT
CAAGTTCACTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTACTTACCTCACCACAGCAGCCTGCAAGCCTGAA
GATATTGCAACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCGTGGACGTTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:17
VM1000 LC
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRERGVPSRFS
GSGSGTDFITFTISSLQPEDIATYYCKQYLSSWTFGQQ

SEQ ID NO:33
VM1000 HC
CAGGTTCACTGGTGCACTCTGGAGCTGAGGTGAAGGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACITGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGG
CCTTGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTAGGAATGATTACTTGAGTACAATCGGATTITCAAGGG
GAGACTCACCATCTCAAGGACACCTCCAAAACCAAGGTGGTCCCTAACATGACCAACATGGACC
CTGTTGGACACGCCACGTATTACTGTCAGAAGAAGGGGGATTACTACGTTACTGGGGCCAGGG

SEQ ID NO:49
VM1000 HC
QVQLVQSGAEVKKPGASVVKVSKASGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGR
LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARRGIFTYWQGQ

도면2

SEQ ID NO:2
 VM1001 LC
 GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCGTCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTATACAGTCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCTGGTACCAAGCA
 GAAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGATCCAG
 ACAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAGACTCACTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTGCAGTGTATTACTGTAAGCAATACTCTCTCGTGGACGTCGGCCAAGGG

SEQ ID NO:18
 VM1001 LC
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRERGIPDRFS
 GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCKQYLSWTFQGQ

SEQ ID NO:34
 VM1001 HC
 CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCTG
 CAAGGCTCTGGCTACGTITTTACTAGCTACTGGCTGCAGTGGATCAGGCACTCCCCATCAGAGG
 CCTTGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTAGGAATGATITATACTTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGACTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGCTTACAATGACCAACATGGACC
 CTGAGACACAGCCACGTATTACTGTAAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGGCCAGGG

SEQ ID NO:50
 VM1001 HC
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGR
 LTISKDTSKNQVVLMTNMDPDTATYYCARRGIFTYWGQG

도면3

SEQ ID NO:3
 VM1002 LC
 GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCGTCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTATACAGTCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCTGGTACCAAGCA
 GAAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGATCCAG
 ACAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAGACTCACTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTGCAGTGTATTACTGTAAGCAATACTCTCTCGTGGACGTCGGCCAAGGG

SEQ ID NO:19
 VM1002 LC
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRERGIPDRFS
 GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCKQYLSWTFQGQ

SEQ ID NO:35
 VM1002 HC
 GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAGGAATCTCCTG
 TAAGGGTTCTGGCTACGTITTTACTAGCTACTGGCTGCAGTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAGG
 GCTTGAGTGGATGGGTTACATTAATCTAGGAATGATITATACTTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGAGTCACGATTACCGCGGACAATCCACGAGCACAGCTACATGGAGCTGAGCAGGCCCTGAGAT
 CTGAGGACACGGCGTGTATTACTGTCAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGGCCAGGG

SEQ ID NO:51
 VM1002 HC
 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYVFTSYWLHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDYTEYNRIFKGR
 VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGIFTYWGQG

도면4

SEQ ID NO:4
 VM1003 LC
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCCTG
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTCTACAGTCAGTGGAGAAGAAACTACTTGGCCTGGTACCGA
 GAAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATTTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGATCCAG
 ACAGGTCAGTGGCAGTGGGTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTCAGTGTATTACTGTAAGCAATACCTCTCTGGACGTTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:20
 VM1003 LC
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLIYWASTRERGIPDRFS
 GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCKQYLSSWTFQGQ

SEQ ID NO:36
 VM1003 HC
 GAGGTCAGCTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTACAGTGAAAATCTCTG
 CAAGGTTCTGGCTACGTCTTACTAGCTACTGGCTGCAGTGGATCAGGAGTCAGGAGG
 CCTTGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGATTGCTCTCCTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGAGATCTGCAGCTAAAGGC
 TGAGGACACTGCCGTGATTACTGTCAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:52
 VM1003 HC
 EVQLVQSGAEVKPGATVKISCKVSGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGRF
 VFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARRGIFTYWGQQ

도면5

SEQ ID NO:5
 VM1004 LC
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCCTG
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTCTACAGTCAGTGGAGAAGAAACTACTTGGCCTGGTACCGA
 GAAACAGGAAAGCTCTAAGCTCCTGATCTTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGATCCAG
 ACAGGTCAGTGGCAGTGGGTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTCAGTGTATTACTGTAAGCAATACCTCTCTGGACGTTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:21
 VM1004 LC
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPLIIYWASTRERGIPDRFS
 GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCKQYLSSWTFQGQ

SEQ ID NO:37
 VM1004 HC
 GAGGTCAGCTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTACAGTGAAAATCTCTG
 CAAGGTTCTGGCTACGTCTTACTAGCTACTGGCTGCAGTGGATCAGGAGTCAGGAGG
 CCTTGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGATTGCTCTCCTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGAGATCTGCAGCTAAAGGC
 TGAGGACACTGCCGTGATTACTGTCAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:53
 VM1004 HC
 EVQLVQSGAEVKPGATVKISCKVSGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGRF
 VFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARRGIFTYWGQQ

도면6

SEQ ID NO:6
 VM1005 LC
 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCATCCTCCCTGTCATCTGATCTGAGGAGACAGAGTCACCATCACT
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTCTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAAACTACTTGGCCTGGTACCGAGCA
 GAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCCTCCATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGTCCCAT
 CAAGGTTCAAGCCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGAGCCTGAA
 GATTTGCAACTTAACTGTAAAGCAATACTCTCTCGTGGACGTICGGCAAGGG

SEQ ID NO:22
 VM1005 LC
 AIQLTQSPSSLASVGDRVITCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLIYWASTRERGVPSRFS
 GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCKQYLSWTFQGQG

SEQ ID NO:38
 VM1005 HC
 GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTACAGTAAAAATCTCCTG
 CAAGGTTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGG
 CCTTGAGTGGCTGGGTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTITCAAGGG
 GAGATTTGCTCTCCTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGAGATCTGAGCTAAAGGC
 TGAGGACACTGCCGTGATTACTGTGCGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:54
 VM1005 HC
 EVQLVQSGAEVKPGATVKISCKVSGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGRF
 VFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARRGIFTYWGQG

도면7

SEQ ID NO:7
 VM1006 LC
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCATCCTCCCTGTCATCTGATCTGAGGAGACAGAGTCACCATCACT
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTCTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAAACTACTTGGCCTGGTATCAGCA
 GAAACAGGGAAAGCTCTAACGCTCTGATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGATCCAG
 ACAGGTTCAAGTGGCAGTGGCTGGGACAGACTCACTCACCACGAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTGCACTGTATTACTGTAAAGCAATACTCTCTCGTGGACGTICGGCAAGGG

SEQ ID NO:23
 VM1006 LC
 DIQMTQSPSSLASVGDRVITCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPLIIYWASTRERGIPDRFS
 GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCKQYLSWTFQGQG

SEQ ID NO:39
 VM1006 HC
 CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTG
 CAAGGCTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGG
 CCTTGAGTGGCTGGGTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTITCAAGGG
 GAGATTTGCTCTCCTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGAGATCTGAGCTAAAGGC
 TGAGGACACTGCCGTGATTACTGTGCGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:55
 VM1006 HC
 QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGR
 VFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARRGIFTYWGQG

도면8

SEQ ID NO:8
 VM1007 LC
 GGCATCCAGTGCACCGACTCCATCTCCCTGCTGCATCTGTAGGGAGACAGAGTCACCATCACT
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTCTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCCTGGTATCAGCA
 GAAACCAGGGAAAGCTCTAAGCTCCCTGATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGGCTCCCT
 CGAGGTTAGTGGCAGTGGGACAGATTCACCTTACCATCAGTAGCCTGGAAAGCTGAA
 GATCTGCAACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCGTGGACGTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:24
 VM1007 LC
 AIQLTQSPSSLASVGDRVTTCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPLIIYWASTRERGVPSRFS
 GSGSGTDFITISLEAEDAATYYCKQYLSSWTFGQG

SEQ ID NO:40
 VM1007 HC
 CAGGTTCACTGGTGCAGTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCTG
 CAAGGCTCTGGCTACGTCTTACTAGCTACTGGCTGCACITGGGTGGACAGGCTCGTGGACAACG
 CCTGAGGTTAGGTTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTITICAAGGG
 GAGAGTCACGATTACCGGGACAAATCACGAGCACAGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT
 CTGAGGACACGGCGTGTATTACTGTCAGGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:56
 VM1007 HC
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTSYWLHWVRQARGQRLEWIGYINPRNDYTEYNRIFKG
 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGTTFYWGQG

도면9

SEQ ID NO:9
 VM1008 LC
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGCTGCATCTGTAGGGAGACAGAGTCACCATCACT
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTCTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAAGCA
 GAAACCTGGCAGGCTCCAGGCCTCCATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGATCCAG
 ACAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAGACTCACITCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTCAGTGTATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCGTGGACGTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:25
 VM1008 LC
 DIQMTQSPSSLASVGDRVTTCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLIIYWASTRERGIPDRFS
 GSGSGTDFITLISLEPEDFAVYYCKQYLSSWTFGQG

SEQ ID NO:41
 VM1008 HC
 CAGGTTCACTGGTGCAGTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCTG
 CAAGGCTCTGGCTACGTCTTACTAGCTACTGGCTGCACITGGGTGGACAGGCTCGTGGACAACG
 CCTGAGGTTAGGTTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTITICAAGGG
 GAGAGTCACGATTACCGGGACAAATCACGAGCACAGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT
 CTGAGGACACGGCGTGTATTACTGTCAGGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:57
 VM1008 HC
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTSYWLHWVRQARGQRLEWIGYINPRNDYTEYNRIFKG
 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGTTFYWGQG

도면10

SEQ ID NO:10
VM1009 LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
TGCAAGTCAGTCAAAGTGTGTTACAGTGCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCTGGTATCAGCA
GAAACCAGGGAAAGCTCTAAGCTCTGATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGGTCCTC
CGAGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACCTTACCATCAGTAGCCCTGGAAAGCTGAA
GATGCTGCAACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCGTGGACGTTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:26
VM1009 LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRERGVPSRFS
GSGSGTDFITFISSLEADEATYYCKQYLSWTFQGQ

SEQ ID NO:42
VM1009 HC

CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAAGGTCTCTG
CAAGGCTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACCTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGG
CCTTGAGTGGCTGGGTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTITCAAGGG
GAGATTGTCTCTCCTTGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGAGATCTGCAGCTAAAGGC
TGAGGACACTGCCGTGTTACTGTCAGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:58
VM1009 HC

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGR
FVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARRGITTGYWGQG

도면11

SEQ ID NO:11
VM1010 LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
TGCAAGTCAGTCAAAGTGTGTTACAGTGCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCTGGTATCAGCA
GAAACCAGGGAAAGCTCTAAGCTCTGATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGGTCCTC
CAAGGTCAGTGGAAAGTGGATCTGGACAGATTTCACCATCAGCAGCTGCAAGCTGAA
GATATTGCAACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCGTGGACGTTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:27
VM1010 LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRERGVPSRFS
GSGSGTDFITFISSLQPEDIATYYCKQYLSWTFQGQ

SEQ ID NO:43
VM1010 HC

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGAGTCTCTGAGGAATCTCTG
TAAGGTTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACCTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGG
CCTTGAGTGGCTGGGTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTITCAAGGG
GAGATTCCACCATCTCAGAGACAACGCCAAGAACACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG
CCGAGGACACGGCTGTGTTACTGTCAGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:59
VM1010 HC

EVQLVQSGAEVKPGESLRISCKVSGYVFTSYWLHWIRQSPSRGLEWLGYINPRNDYTEYNRIFKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGITTGYWGQG

도면12

SEQ ID NO:12
 VM1011 LC
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTAACTACAGTCAGTGGAGAAGAACTACTTGCCCTGGTACCAAGCA
 GAAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGATCCAG
 ACAGGGTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTCACTTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTGCACTGTATTACTGTAAGCAATACCTCTCCTGTGGACGTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:28
 VM1011 LC
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRERGIPDRFS
 GSGSGTDFTLTSRLEPEDFAVYCKQYLSWTFQGQ

SEQ ID NO:44
 VM1011 HC
 CAGGTCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCACAGACCCCTGCTCCCTCACCTG
 CACTGTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGATCCGCAGCCCCCAGGGAAAGGG
 GCTGGAGTGGATTGGTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGAGTCACGATTACCGGGACAATCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT
 CTGAGACAGCCGTATTACTGTGCGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:60
 VM1011 HC
 QVQLQESGPGLVKPSQILSLTCTVSGYVFTSYWLHWIRQPPGKLEWIGYINPRNDYTEYNRIFKGRVT
 ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGITTFTYWGQG

도면13

SEQ ID NO:13
 VM1012 LC
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGCTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
 TGCAAGTCAGTCAAAGTGTAACTACAGTCAGTGGAGAAGAACTACTTGCCCTGGTACCAAGCA
 GAAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGGTCCCAT
 CAAGGGTCACTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTACTTCACCATCAGCAGCCTGCAAGCCTGAA
 GATATTGCAACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCCTGTGGACGTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:29
 VM1012 LC
 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRERGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTSRLEPDIAFYCKQYLSWTFQGQ

SEQ ID NO:45
 VM1012 HC
 CAGGTTCACTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCTG
 CAAGGCCTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
 GCTTGAGTGGATGGGTTACATTAATCTAGGAATGATTACTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAGAAGACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG
 CCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:61
 VM1012 HC
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTSYWLHWVVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYNRIFKG
 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGITTFTYWGQG

도면14

SEQ ID NO:14
 VM1013 LC
 GCCATCCAGTGACCCAGTCTCCATCCTCCGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
 TGCAAGTCCAGTCAAAGTGTAACTACAGTCAGTGAGAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAAGCA
 GAAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGTCCCAT
 CAAGGGTACGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACCTCACCATCAGCAGCCCTGAGCCCTGAA
 GATTTGCACTTAACTGTAAAGCAATACTCTCGTGGACGTTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:30
 VM1013 LC
 AIQLTQSPSSLASVGDRVIIICKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLIYWASTRERGVPSRFS
 GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCKQYLSWTFGQQ

SEQ ID NO:46
 VM1013 HC
 CAGGTGAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCACAGACCCGTCCCTCACCTG
 CACTGTCCTGGCTACGTAACTAGCTACTGGCTGACTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAAGGG
 GCTGGAGTGGATGGTACATTAATCTAGGAATGATTAACGTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGATTCACCATCTCAGAGACAACGCCAAGAACTCACGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG
 CCGAGGACACGGCTGTTAACTGTGAGAAGGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:62
 VM1013 HC
 QVQLQESGPLVKPSQTLSTLCTVSGYVFTSYWLHWIRQPPGKLEWIGYINPRNDYTEYNRIFKGRFT
 ISRDNAKNSLYQMSLRAEDTAVYYCARRGTTFYWGQQ

도면15

SEQ ID NO:15
 VM1014 LC
 GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGGCCTGTCCCCCTGGGAAAAAGCCCCCTCTCC
 TGGAAAGTCAGTCAGTAAAGTGTAACTACAGTGAGTGGAAAAGAACTACTTGGCCTGGTATCAGCA
 GAAACAGGGAAAGCTCTAACGCTCTGATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGTCCCT
 CCAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCACCATCAGCAGCCCTGAAAGCTGAA
 GATTTGCAACTTAACTGTAAAGCAATACTCTCGTGGACGTTGGCCAAGGG

SEQ ID NO:31
 VM1014 LC
 EIVLTQSPATLALSPGEKAPLSWKSSQSVLYSGVEKNYLAWYQQKPGKAPKLIYWASTRERGVPSRF
 SGSGSGTDFLTISLQEDFATYYCKQYLSWTFGQQ

SEQ ID NO:47
 VM1014 HC
 CAGGTTCAGCTGGTGAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTACAGTGAAAATCTCTG
 CAAGGTTCTGGCTACGTAACTAGCTACTGGCTGACTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAAGGG
 GCTGGAGTGGATTGGTACATTAATCTAGGAATGATTAACGTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
 GAGAGTCACGATTACCGGGACAATCCACGAGCACAGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT
 CTGAGGACACGGCCGTATTACTGTGAGAAGGGGGATTACTACGTTACTGGGCCAGGG

SEQ ID NO:63
 VM1014 HC
 QVQLVQSGAEVKPGATVKISCKVSGYVFTSYWLHWIRQPPGKLEWIGYINPRNDYTEYNRIFKGRV
 TTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGTTFYWGQQ

도면16

SEQ ID NO:16
VM1015 LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGGCCTTGTCCCCCTGGGAAAAAGCCCCCTCTCC
TGGAAAGTCCAGTCAAAGTGTGTTATACAGTGGAGTGGAAAAGAACTACTTGGCCTGTTATCAGCA
GAAACCAGGGAAAGCTCTAAGCTCTGATCTATTGGCATCCACTAGGGAAAGGGGGTCCCT
CCAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACCATCAGCAGCCCTGCAAGCTGAA
GATTTGCAACTTAACTGTAAGCAATACTCTCTCGTGGACGTCGGCCAAGGG

SEQ ID NO:32
VM1015 LC
EIVLTQSPATLALSPGEKAPLSWKSSQSVLYSGVEKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRERGVPSRF
SGSGSGTDFLTISLQAEDFAYYCKQYLSWTFGQQ

SEQ ID NO:48
VM1015 HC
GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGACCAAGTGAAGAAGCCCAGGGAGTCTCTGAGGATCTCTG
TAAGGGTTCTGGCTACGTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
GCTTGAGTGGATGGGTACATTAATCTAGGAATGATTATACTGAGTACAATCGGATTTCAGGG
GAGAGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCACACCCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGG
CCTGGACACGCCATGTAACTGTCGAGAAGGGGGATTACTACGTTCTACTGGGCCAGGGA

SEQ ID NO:64
VM1015 HC
EVQLVQSGPEVKKPGE\$LRISCKGSGYVFTSYWLHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDYTEYNRIFKGR
VTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRGITTFYWGQQ

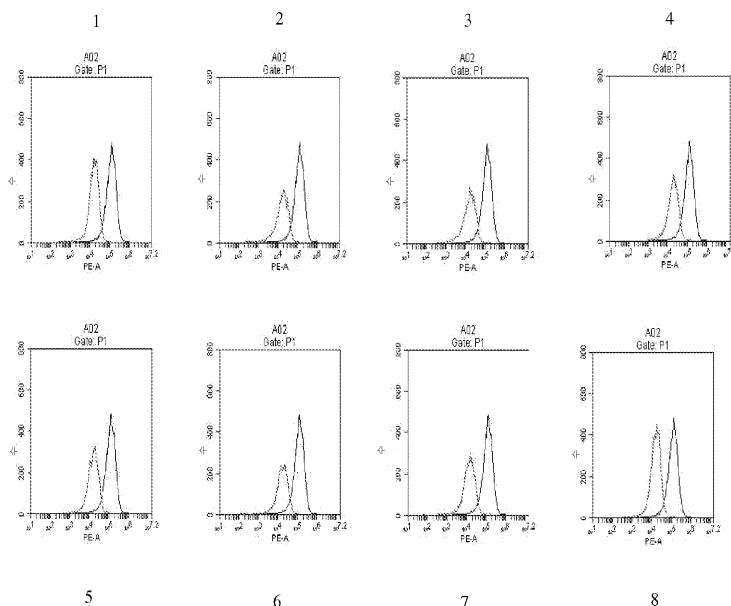
도면17

클론	ELISA OD 450
VM1000	0.5174
VM1001	0.3856
VM1002	0.4953
VM1003	0.5600
VM1004	0.4437
VM1005	0.3725
VM1006	0.6377
VM1007	0.5379
VM1008	0.6700
VM1009	0.5968
VM1010	0.6998
VM1011	0.1500

도면18

클론	ELISA OD 450
VM006G	20.00
VM006H	5.00
VM1000	0.50
VM1001	0.22
VM1002	0.33
VM1003	0.34
VM1004	0.80
VM1005	19.30
VM1006	0.30
VM1007	1.00
VM1008	1.50
VM1009	0.45
VM1010	4.80
VM1011	0.25
VM1012	1.50
VM1013	2.40
VM1014	0.40
VM1015	0.80

도면19



도면20

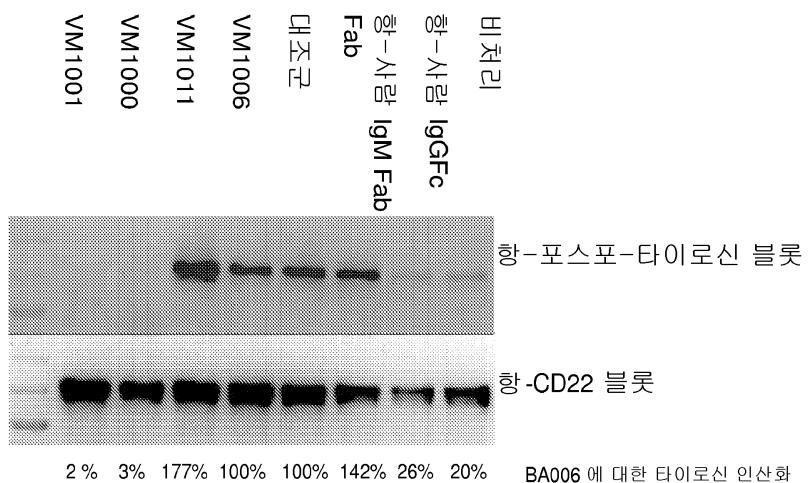
<u>클론</u>	FACS에 의한 Daudi 내부화. 이동%
BA006G	74.21%
VM1000	85.93%
VM1001	86.42%
VM1002	84.60%
VM1003	70.80%
VM1004	87.07%
VM1005	86.39%
VM1006	88.33%
VM1007	85.00%
VM1008	69.44%
VM1009	69.44%
VM1010	65.73%
VM1011	87.13%
VM1012	87.51%
VM1013	88.82%
VM1014	85.38%
VM1015	86.60%

도면21

공조점에 의한 Daudi 내부화		
<u>클론</u>	<u>KD (nM)</u>	<u>(RMF)</u>
LL2 (마우스 Mab)	20.00	ND
대조군	5.00	~10
VM1000	0.50	~100
VM1001	0.22	~100
VM1002	0.33	~150
VM1003	0.34	~150
VM1004	0.80	~100
VM1006	2.70	~200
VM1007	1.00	~200
VM1011	0.26	~200

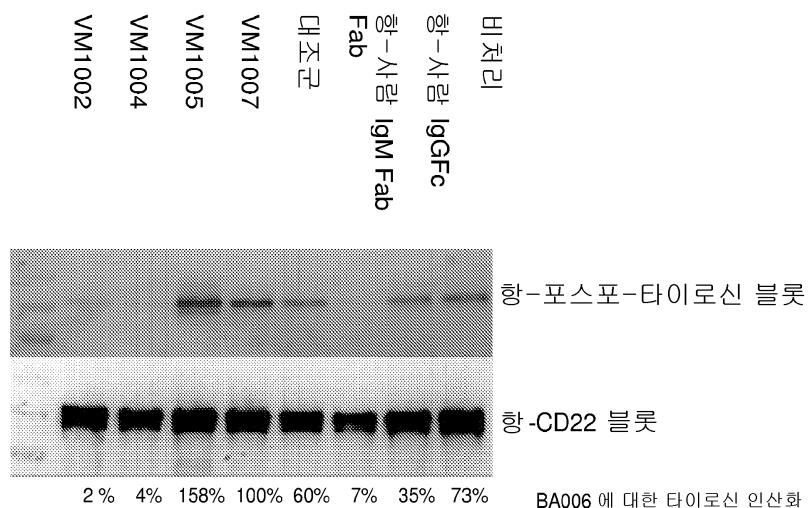
도면22a

Daudi 세포로부터의 면역침전

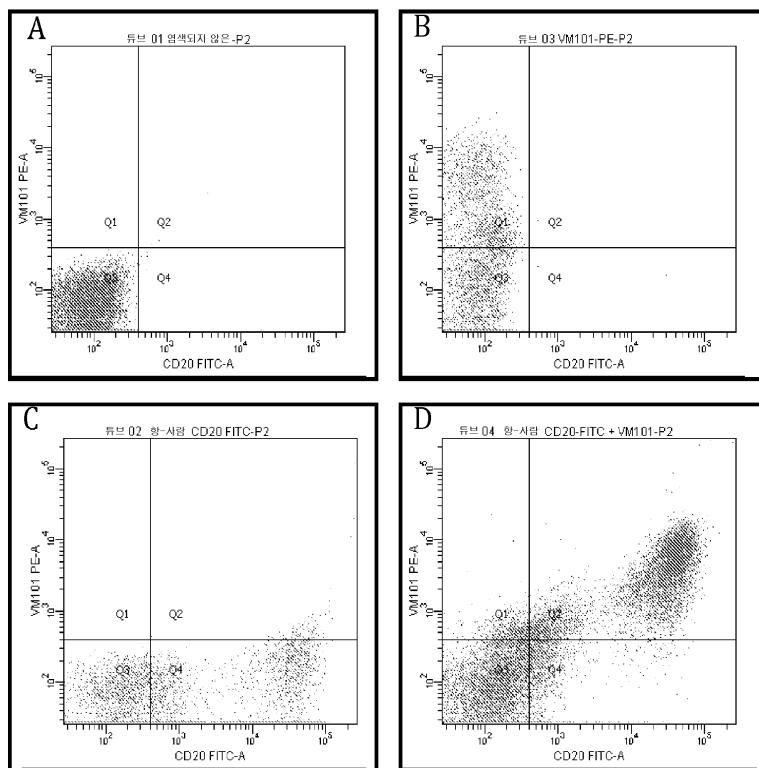


도면22b

Daudi 세포로부터의 면역침전



도면23



도면24

항체	수율 (mg/l)
대조군	276.2
항체 1	219.8
항체 2	255.4
항체 3	221.7
트라스투주마브	265

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOATLA, LLC

<120> ANTI-CD22 ANTIBODIES

<130> Mendelsohn1.2(P)

<150> US 61/638,834

<151> 2012-04-26

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 1

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc	ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtca aagtgttta tacagtgcag	tggagaagaa ctacttggcc	120
tggtatcagc agaaaccagg gaaagctct aagctctga	tctattggc atccactagg	180

gaaagggggg tcccatcaag gttcagtgg agtggatctg	ggacagatt tacttcacc	240
atcagcagcc tgcagcctga agatattgca acatattact	gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg		318

<210> 2

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 2

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc	ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtca aagtgttta tacagtgcag	tggagaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagg agaaacctgg ccaggctccc aggctctca	tctattggc atccactagg	180

gaaagggggg tcccagacag gttcagtggc agtgggtctg	ggacagactt cacttcacc	240
atcagcagac tggagcctga agatttgca gtgtattact	gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg		318

<210> 3

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 3

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc	ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtca aagtgttta tacagtgcag	tggagaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagg agaaacctgg ccaggctccc aggctctca	tctattggc atccactagg	180

gaaaggggga tcccagacag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt cacttcacc	240
atcagcagac tggagcctga agatttgca gtgtattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318
<210> 4	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 4	
gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc ctccagggg aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtca aagtgttta tacagtgcag tggagaagaa ctactggcc	120
tggtaccagg agaaacctgg ccaggctccc aggctctca tctattggc atccactagg	180
gaaaggggga tcccagacag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt cacttcacc	240
atcagcagac tggagcctga agatttgca gtgtattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318
<210> 5	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 5	
gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc ctccagggg aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtca aagtgttta tacagtgcag tggagaagaa ctactggcc	120
tggtatcagg agaaaccagg gaaagctct aagctctga tctattggc atccactagg	180
gaaaggggga tcccagacag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt cacttcacc	240
atcagcagac tggagcctga agatttgca gtgtattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318
<210> 6	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 6	

gccccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc
atcacttgca agtccagtc aagtgttta tacagtgcag tggagaagaa ctacttggcc
tggatcaggc agaaacctgg ccaggctccc aggctccatca tctattggc atccactagg 60
120
180

gaaagggggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagatit cacttcacc
atcagcagcc tgcagcctga agatttgca acttattact gtaagcaata ccttcctcg 240
300
318

<210> 7

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 7

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc
atcacttgca agtccagtc aagtgttta tacagtgcag tggagaagaa ctacttggcc
tggatcaggc agaaaccagg gaaagctctt aagctccatca tctattggc atccactagg 60
120
180

gaaagggggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagatit cacttcacc
atcagcagcc tgcagcctga agatttgca acttattact gtaagcaata ccttcctcg 240
300
318

<210> 8

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 8

gccccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc
atcacttgca agtccagtc aagtgttta tacagtgcag tggagaagaa ctacttggcc
tggatcaggc agaaaccagg gaaagctctt aagctccatca tctattggc atccactagg 60
120
180

gaaagggggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagatit cacttcacc
atcagcagcc tgcagcctga agatttgca acttattact gtaagcaata ccttcctcg 240
300
318

<210> 9

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc	60
atcaacttgca agtccagtc aagtgtttta tacagtgcag tggagaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagc agaaacctgg ccaggctccc aggctcctca tctattggc atccactagg	180

gaaagggggg tcccagacag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt cacttcacc	240
atcagcagac tggagcctga agatttgca gtgtattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318

<210> 10

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 10

gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctcagggggaa aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtc aagtgtttta tacagtgcag tggagaagaa ctacttggcc	120
tggtatcagc agaaaccagg gaaagctct aagctcctga tctattggc atccactagg	180

gaaagggggg tcccctcgag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactttacc	240
atcagtagcc tggaaagctga agatgctgca acatattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318

<210> 11

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 11

gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctcagggggaa aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtc aagtgtttta tacagtgcag tggagaagaa ctacttggcc	120
tggtatcagc agaaaccagg gaaagctct aagctcctga tctattggc atccactagg	180

gaaagggggg tcccatcaag gttcagtggaa agtggatctg ggacagattt tacttcacc	240
---	-----

atcagcagcc tgcagcctga agatattgca acatattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318
<210> 12	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 12	
gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtca aagtgttta tacagtgcag tggagaagaa ctactggcc	120
tggtaccagg agaaacctgg ccaggctccc aggctccta tctattggc atccactagg	180
gaaagggggg tcccagacag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt cacttcacc	240
atcagcagac tggagcctga agatttgca gtgtattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318
<210> 13	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 13	
gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca agtccagtca aagtgttta tacagtgcag tggagaagaa ctactggcc	120
tggtaccagg agaaacctgg ccaggctccc aggctccta tctattggc atccactagg	180
gaaagggggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt tacttcacc	240
atcagcagcc tgcagcctga agatattgca acatattact gtaagcaata ccttcctcg	300
tggacgttcg gccaaggg	318
<210> 14	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 14	
gccccatccagg tgacccaggc tccatcctcc ctgtctgcatt ctgttaggaga cagagtccacc	60

atcaacttgc a gtc cag tca a a g t g t t t a t a c a g t g c a g t g g a a g a a c t a t t g g c c	120
t g g t a c c a g c a g a a a c c t g g c c a g g c t c c a g g c t c t a t t g g g c a t t c a c t a g g	180
g a a a g g g g g g t c c c a t c a a g g t c a g c g g c a g t g g a t c g g g a a g a g a t t t c a c c	240
a t c a g c a g c c t g a a g a t t t g c a a c t t a t t a c t g t a a g c a a t a c c t c c t c g	300
t g g a c g t t c g g c c a a g g g	318
<210> 15	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 15	
g a a a t t g t g t g a c a c a g t c t c c a g c c a c c t g g c c t t g t c c c c t g g g g a a a a g c c c c c	60
c t c t c c t g g a a g t c a g t c a a a g t g t t t a t a c a g t g g a g t g g a a a a a g a a c t a t t g g c c	120
t g g t a t c a g c a g a a a c c a g g g a a a g c t c t a a g c t c t g a t c t a t t g g g c a t t c a c t a g g	180
g a a a g g g g g g t c c c t c c a g g t c a g t g g c a g t g g a t c g g a t t t c a c c	240
a t c a g c a g c c t g a a g a t t t g c a a c t t a t t a c t g t a a g c a a t a c c t c c t c g	300
t g g a c g t t c g g c c a a g g g	318
<210> 16	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 16	
g a a a t t g t g t g a c a c a g t c t c c a g c c a c c t g g c c t t g t c c c c t g g g g a a a a g c c c c c	60
c t c t c c t g g a a g t c a g t c a a a g t g t t t a t a c a g t g g a g t g g a a a a a g a a c t a t t g g c c	120
t g g t a t c a g c a g a a a c c a g g g a a a g c t c t a a g c t c t g a t c t a t t g g g c a t t c a c t a g g	180
g a a a g g g g g g t c c c t c c a g g t c a g t g g c a g t g g a t c g g a t t t c a c c	240
a t c a g c a g c c t g a a g a t t t g c a a c t t a t t a c t g t a a g c a a t a c c t c c t c g	300
t g g a c g t t c g g c c a a g g g	318
<210> 17	
<211> 106	
<212> PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRLIYWASTRERGIP

DRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCKQYLSSWTFGQG

<400> 18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 19

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 20

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 21

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 21

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400>

22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 23

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 23

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 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 25

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 25

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 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 27

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 27

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 28

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400>

29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 31

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 31

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ala Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Pro Leu Ser Trp Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Gly Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 32

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ala Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Pro Leu Ser Trp Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Gly Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly

100 105

<210> 33

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 33

caggttcagc tggcagtc tggagcttag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcagg cttctggcta cgttttact agctactggc tgcaactggat caggcagtcc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggttac attaattcata ggaatgatta tactgagtac	180
aatcgattt tcaagggag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggc	240

cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggaa	327

<210> 34

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 34

caggttcagc tggcagtc tggagcttag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcagg cttctggcta cgttttact agctactggc tgcaactggat caggcagtcc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggttac attaattcata ggaatgatta tactgagtac	180
aatcgattt tcaagggag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggc	240

cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggaa	327

<210> 35

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 35

gaagtgcagc tggcagtc tggagcagag gtggaaaagc ccggggagtc tctgaggatc	60
tcctgttgg cttctggcta cgttttact agctactggc tgcaactggat gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggttac attaattcata ggaatgatta tactgagtac	180
aatcgattt tcaagggag agtcacgatt acccgccaca aatccacgag cacagcctac	240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 36	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 36	
gaggtccagc tggtacagtc tggggcttag gtgaagaagc ctggggctac agtggaaatc	60
tcctgcaagg tttctggcta cgttttact agctactggc tgcaactggat caggcagtcc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggtac attaatccta ggaatgatta tactgagttac	180
aatcggattt tcaagggag atttgccttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat	240
ctgcagatct gcagcctaaa ggctgaggac actgcccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 37	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 37	
gaggtccagc tggtacagtc tggggcttag gtgaagaagc ctggggctac agtggaaatc	60
tcctgcaagg tttctggcta cgttttact agctactggc tgcaactggat caggcagtcc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggtac attaatccta ggaatgatta tactgagttac	180
aatcggattt tcaagggag atttgccttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat	240
ctgcagatct gcagcctaaa ggctgaggac actgcccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 38	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 38	
gaggtccagc tggtacagtc tggggcttag gtgaagaagc ctggggctac agtggaaatc	60

tcctgcaagg tttctggcta cgttttact agctactggc tgcactggat caggcagtcc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggttac attaatccta ggaatgatta tactgagtagc	180
aatcggattt tcaagggag atttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat	240
ctgcagatct gcagccaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 39	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 39	
caggttcagc tggcgcagtc tggagcttag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60
tcctgcaagg cttctggcta cgttttact agctactggc tgcactggat caggcagtcc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggttac attaatccta ggaatgatta tactgagtagc	180
aatcggattt tcaagggag atttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat	240
ctgcagatct gcagccaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 40	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 40	
caggttcagc tggcgcagtc tggagcttag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60
tcctgcaagg cttctggcta cgttttact agctactggc tgcactgggt gcgacaggct	120
cgtggacaac gccttgagtg gataggttac attaatccta ggaatgatta tactgagtagc	180
aatcggattt tcaagggag agtcacgatt accgggaca aatccacgag cacggctac	240
atggagctga gcagccigag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 41	
<211> 327	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 41

cagggtcagc tgggtcagtc tggagcttag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaggc tttctggta cgttttact agctactggc tgcaactgggt ggcacaggct	120
cgtggacaac gccttgagtg gatagggtac attaatccta ggaatgatta tactgagttac	180
aatcggtttt tcaaggggag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacgcctac	240

atggagctga gcagccttagt atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggaa	327

<210> 42

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 42

cagggtcagc tgggtcagtc tggagcttag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaggc tttctggta cgttttact agctactggc tgcaactggat caggcagtc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggttac attaatccta ggaatgatta tactgagttac	180
aatcggtttt tcaaggggag atttgccttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat	240

ctgcagatct gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggaa	327

<210> 43

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 43

gaagtgcagc tgggtcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaggatc	60
tcctgttaagg ttctggta cgttttact agctactggc tgcaactggat caggcagtc	120
ccatcgagag gccttgagtg gctgggttac attaatccta ggaatgatta tactgagttac	180
aatcggtttt tcaaggggag attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat	240

ctgcaaatga acagccttagt agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
--	-----

attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 44	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 44	
caggtgcagc tgcaggagtc gggccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggcta cgttttact agctactggc tgcaactggat ccgcgcagccc	120
ccagggaaagg ggctggagtg gatggttac attaatccta ggaatgatta tactgagttac	180
aatcggattt tcaagggag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 45	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 45	
caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60
tccgcagg cttctggcta cgttttact agctactggc tgcaactgggt gcgcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatggttac attaatccta ggaatgatta tactgagttac	180
aatcggattt tcaagggag attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccaggga	327
<210> 46	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 46	
caggtgcagc tgcaggagtc gggccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggcta cgttttact agctactggc tgcaactggat ccgcgcagccc	120

ccagggaaagg ggctggagtg gattggttac attaatccta ggaatgatta tactgagtac	180
aatcggattt tcaagggag attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccagggaa	327
<210> 47	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antibody	
<400> 47	
caggttcagc tgggtcagtc tggagcttagt gtgaagaagc ctggggctac agtggaaatc	60
tcctgcaagg tttctggcta cgttttact agtactggc tgcactggat ccggcagccc	120
ccagggaaagg ggctggagtg gattggttac attaatccta ggaatgatta tactgagtac	180
aatcggattt tcaagggag agtcacgatt accgcccaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccagggaa	327
<210> 48	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> anti	
<400> 48	
gaagtgcagc tgggtcagtc tggaccagaa gtggaaaagc ccggggagtc tctgaggatc	60
tcctgttaagg gttctggcta cgttttact agtactggc tgcactgggt ggcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggttac attaatccta ggaatgatta tactgagtac	180
aatcggattt tcaagggag agtcaccatc tcagccaca agtccatcaa caccgctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctggac accgcccattgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccagggaa	327
<210> 49	
<211> 109	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> antibody

<400> 49

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val

65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 50

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 50

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val

65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 51

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 51

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210>

52

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 52

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 53

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> antibody

<400> 53

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 54
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody
 <400> 54

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

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

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

100 105
 <210> 55
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody
 <400> 55

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 56

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 56

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 57

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 57

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 58

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 59

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 59

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210>

60

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 60

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 61

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> antibody

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 62
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody
 <400> 62

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

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

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105
 <210> 63
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody
 <400> 63

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 64

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody

<400> 64

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105