

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0122859 (43) 공개일자 2011년11월11일	
(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-7022435 (22) 출원일자(국제출원일자) 2010년02월23일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2011년09월23일 (86) 국제출원번호 PCT/IB2010/000353 (87) 국제공개번호 WO 2010/095031 국제공개일자 2010년08월26일 (30) 우선권주장 61/154,524 2009년02월23일 미국(US)		(71) 출원인 그렌마크 파머수티칼스 에스. 아. 스위스, 2300 라 쇼드폰, 슈명 드 라 폼베타 5 (72) 발명자 블레인, 스타니스라스 스위스, 씨에이치-2300 라 쇼-드-폰, 5, 케민 드 라 폼베타 스케그로, 다르코 스위스, 씨에이치-2300 라 쇼-드-폰, 5, 케민 드 라 폼베타 (뒷면에 계속) (74) 대리인 이원희	

전체 청구항 수 : 총 110 항

(54) C D 1 9 에 결합하는 인간화된 항체 및 그것의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 CD19(human CD19)에 결합하는 인간화 항체(humanized antibody) 또는 그것의 단편(fragment)에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄(heavy chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR3; 및/또는 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄(light chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR3로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화 항체 또는 그것의 단편에 관한 것이다.

(72) 발명자

드본네필레, 크리스토프

스위스, 씨에이치-2300 라 쇼-드-퐁, 5, 케민 드
라 콤베타

베르슈힌게르, 마르틴

스위스, 씨에이치-2300 라 쇼-드-퐁, 5, 케민 드
라 콤베타

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3; 및/또는 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3을 포함하는 인간 CD19(human CD19)에 결합하는 인간화된 항체(humanized antibody) 또는 그것의 단편(fragment).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR1, 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR1, 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2, 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain) CDR1, 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3; 및 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) CDR1, 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2, 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 19, 20, 21, 22 및 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위 서열(heavy chain variable region sequence)을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 19, 20, 21, 22 또는 42의 구조 부위 서열(structure region sequence)에 최소한 80%의 상동성을 갖는 중쇄 가변 구조 부위 서열(heavy chain variable framework region sequence)을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 7

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 21의 중쇄 가변 부위 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호:21의 구조 부위 서열에 최소한 80% 상동성을 갖는 중쇄 가변 구조 부위 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 9

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 V3-33*01(서열 번호: 11), V3-11*01(서열 번호: 12), V3-30*-18(서열 번호: 13) 및 V3-48*01(서열 번호: 14)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자(human gene)로부터 유래되거나 또는 그 생산물(product)인 중쇄 가변 구조 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 최소한 하나의 중쇄 CDR이 최소한 하나의 아미노산 변형(amino acid modification)을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 중쇄 CDR1 내에서 아미노산 치환(substitution) Y32F를 포함하고, 여기서 상기 아미노산 위치(position)는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 중쇄 CDR2 내에서 아미노산 치환 Y58F 또는 Y59F를 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 중쇄 CDR3 내에서 Y96F, Y97F, Y98F 및 Y100pF로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 14

제 5항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 중쇄 가변 부위의 구조 부위의 최소한 하나는 상응하는 쥐의 항체(corresponding murine antibody)의 중쇄 가변 부위의 상응하는 구조 부위로부터 최소한 하나의 아미노산 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 37, 42, 48, 49, 67, 71, 78 및 94로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 아미노산의 치환으로 구성되고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 42, 67, 71, 78 및 94로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 아미노산의 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 G42R, F67L, R71K, L78V 및 R94K로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 치환을 포함하고, 이는 만약 아미노산 변형이 R94K이면 그 중쇄 가변 부위 서열이 서열 번호: 19 또는 서열 번호: 20이 아닌 것을 조건으로 하며, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 18

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 서열(light chain variable region sequence)을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편

청구항 19

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41의 구조 부위 서열(framework region sequence)과 최소한 80%의 상동성을 갖는 경쇄 가변 구조 부위 서열(light chain variable framework region sequence)을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 20

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 41의 경쇄 가변 부위 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 21

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 41의 구조 부위 서열과 최소한 80% 상동성을 갖는 경쇄 가변 구조 부위 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편

청구항 22

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 V1-5*03(서열 번호: 3), V1-27*01(서열 번호:4), V1-39*01(서열 번호: 5) 및 V1-12*01(서열 번호: 6)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래되거나 또는 그 생산물(product)인 경쇄 가변 구조 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간

화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 23

제 1항 내지 제 4항 또는 제 18항 내지 22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 경쇄 CDR의 최소한 하나는 최소한 하나의 아미노산 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 경쇄 CDR1 내에서 아미노산 치환 Y32F를 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 25

제 23항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 경쇄 CDR3 내에서 N92A, T93A 및 T93V로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 26

제 18항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 경쇄 가변 부위의 최소한 하나의 구조 부위(framework region)는 상응하는 쥐의 항체(corresponding murine antibody)의 경쇄 가변 부위의 상응하는 구조 부위로부터 최소한 하나의 아미노산 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 27

제 26항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 44, 71 및 87로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 28

제 26항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 P44V, P44I, P44L, F71Y, F71H, F71S, F71T 및 Y87F로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 29

제 26항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 P44V, P44I, F71Y, 및 Y87로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 30

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 19, 20, 21, 22 및 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위 서열; 및
- (b) 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 31

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 21의 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 부위 서열; 및
- (b) 서열 번호: 41의 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 부위 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 32

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 및 55로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 33

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 및 63으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 34

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 37의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 35

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위 및 서열 번호: 60의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 36

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 37

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 37의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변

부위 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 38

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 37의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위 및 서열 번호: 49의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 39

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위 및 서열 번호: 49의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 40

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 43의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 41

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 64의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열; 및
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 42

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열; 및
- (b) 서열 번호: 67의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 43

제 4항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열; 및
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 44

제 1항 내지 제 40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 중쇄 및/또는 경쇄 불변 부위(constant region)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 45

제 44항에 있어서, 상기 인간 불변 부위는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, 및 IgE로 구성된 인간 면역 글로불린(human immunoglobulin)의 군으로부터 선택되는 인간 중쇄 불변 부위(human heavy constant region)인 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 46

제 44항에 있어서, 상기 인간 중쇄 불변 부위는 인간 IgG(human IgG)인 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 47

제 44항에 있어서, 상기 인간 중쇄 불변 부위는 인간 IgG1인 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 48

제 44항에 있어서, 상기 인간 중쇄 불변 부위는 인간 IgG1으로부터 유래된 CH1를 포함하는 아형 변이(isotypic variant), 인간 IgG1으로부터의 유래된 연결부위(hinge) 및 인간 IgG3로부터의 유래된 Fc 부위(Fc region)를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 49

제 48항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 124의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열; 및
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 50

제 48항에 있어서, 상기 아형 변이는 제 47항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편과 비교하여 개선된 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)을 나타내는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 51

제 44항에 있어서, 상기 인간 경쇄 불변 부위는 인간 카파(human kappa) 및 인간 람다(human lamda)로 구성된 인간 면역 글로불린의 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 52

제 51항에 있어서, 상기 인간 경쇄 불변 부위는 인간 카파(human kappa)인 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 53

제 1항 내지 제 52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 전장(full-length)의 항체(full length antibody)인 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 54

제 1항 내지 제 52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, 이중특이적 단일 사슬 Fv 이량체(bispecific single chain dimers), 이중항체(diabodies), 삼중항체(triabodies) 및 동일하거나 또는 상이한 항체와 유전적으로 연결된 scFv로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 55

제 1항 내지 제 52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 모 항체(parent antibody)의 인간 IgG Fc 부위와 관련된 최소한 하나의 아미노산 변형을 포함하는 변이 인간 IgG Fc 부위로 구성되는 반면에, 상기 변이 인간 IgG Fc 부위로 구성되는 항체가 모 항체와 비교하여 변형된(altered) 작용기 기능(effector function)을 나타내는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 56

제 55항에 있어서, 상기 작용기 기능은 보체 의존적 세포 독성(complement dependent cytotoxicity; CDC) 및/또는 항체 의존적 세포 매개 세포독성(antibody dependent cell mediated cytotoxicity; ADCC)인 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 57

제 55항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 269, 274, 276, 298, 324 및 334로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 58

제 55항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 E269D, K274Q, N276K, S298A, S324N, 및 K334R로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 59

제 55항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 269/274, 269/276, 269/298, 269/324, 269/334, 274/276, 274/298, 274/324, 274/334, 276/298, 276/324, 276/334, 298/324, 298/334, 324/334, 269/274/276, 269/274/298, 269/274/324, 269/274/334, 269/276/298, 269/276/324, 269/276/334, 269/298/324, 269/298/334, 274/276/298, 274/276/324, 274/276/334, 274/298/324, 274/298/334, 276/298/324, 및 276/298/334으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 아미노산 치환의 조합을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위

치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 60

제 55항에 있어서, 상기 아미노산 변형은 E269D/K274Q, E269D/N276K, E269D/S298A, E269D/S324N, E269D/K334R, K274Q/N276K, K274Q/S298A, K274Q/S324N, K274Q/K334R, N276K/S298A, N276K/S324N, N276K/K334R, S298A/S324N, S298A/K334R, S324N/K334R, E269D/K274Q/N276K, E269D/K274Q/S298A, E269D/K274Q/S324N, E269D/K274Q/K334R, E269D/N276K/S298A, E269D/N276K/S324N, E269D/N276K/K334R, E269D/S298A/S324N, E269D/S298A/K334R, K274Q/N276K/S298A, K274Q/N276K/S324N, K274Q/N276K/K334R, K274Q/S298A/S324N, K274Q/S298A/K334R, N276K/S298A/S324N, 및 N276K/S298A/K334R으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환의 조합을 포함하고, 여기서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트(Kabat)의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 61

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 114의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 62

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 115의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 63

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 116의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 64

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 117의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 65

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 118의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 66

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 119의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 67

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 120의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 68

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 121의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 69

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 122의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 70

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은

- (a) 서열 번호: 123의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열;
- (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 71

제 46항에 있어서, 상기 인간 Fc 부위에 결합한 성숙한 중심 탄수화물 구조(mature core carbohydrate structure)는 푸코오즈(fucose)가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 72

모 항체(parent antibody)의 아미노산 위치 324에서 세린(serine)은 아스파라긴(asparagine)으로 치환된 아미노산 치환 S324N를 포함하는 변이 인간 IgG Fc 부위(variant human IgG Fc region)를 포함하는 반면, 상기 변이 인간 IgG Fc 부위로 구성되는 항체는 모 항체와 비교하여 개선된 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)을 나타내는 것을 특징으로 하는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 73

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 상응하는 키메라 항체(chimeric antibody)의 결합과 비교하여 최소한 10%의 중간-값 형광도(Mid-Point Fluorescence; MPF)로 라지 종양 세포(Raji tumor cell)에 결합하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 74

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 50nM 또는 그 이하의 친화력(K_d)으로 인간 CD19에 결합하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 75

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 그 상응하는 키메라 항체의 최소한 20% CD19 결합 친화력(K_d)을 보유하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 76

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체는 라지 종양 세포(Raji tumor cell)에 결합하는 것에 대해 50nM 또는 그 이하의 친화력(K_i)으로 경쟁하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 77

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 라지 종양 세포(Raji tumor cell)에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 78

제 77항에 있어서, 세포자멸사는 최소한 10%의 라지 종양 세포(Raji tumor cell)에서 유도되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 79

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 라지 종양 세포(Raji tumor cell)에서 ADCC 활성을 유도하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 80

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 악성 B 세포(malignant B-cell)의 증식(proliferation)을 억제하는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 81

제 80항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 상응하는 키메라 항체에 의한 악성 B 세포 증식 억제의 최소한 60% 나타내는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 82

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 라지 종양 세포에서 클론 형성능력(clonogenicity)을 억제하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 83

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 혈액에서 B 세포의 고갈(depletion)을 야기시키는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 84

제 83항에 있어서, 상기 야기되는 B 세포 고갈은 상응하는 키메라 항체에 의해 야기되는 B 세포 고갈과 최소한 동일한 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 85

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 라지 종양 세포로 내재화(internalization)되는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 86

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체는 65℃ 이상의 FAB 단편 내열성 온도(FAB fragment thermostability temperature)를 갖는 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 87

제 86항에 있어서, 상기 인간화된 항체의 FAB 단편 내열성 온도는 모의 쥐 항체(parental murine antibody)의 AB 단편 내열성 온도와 동등한 것을 특징으로 하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 88

제 1항 내지 제 72항 중 어느 하나의 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 암호화하는(encoding)하는 분리된 핵산

(isolated nucleic acid).

청구항 89

어세션 넘버(accession No.) DSM 23302을 갖는 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 미생물에 있는 것과 같은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 핵산 서열을 암호화하는 중쇄를 포함하는 분리된 핵산.

청구항 90

어세션 넘버(accession No.) DSM 23303을 갖는 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 미생물에 있는 것과 같은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 핵산 서열을 암호화하는 경쇄를 포함하는 분리된 핵산.

청구항 91

제 88항의 분리된 핵산 또는 제 89항 및 제 90항의 분리된 핵산을 포함하는 벡터(vector).

청구항 92

제 88항의 분리된 핵산 또는 제 89항 및 제 90항의 분리된 핵산 또는 제 91항의 벡터를 포함하는 숙주 세포(host cell).

청구항 93

핵산이 발현되고 항체가 생성되기 위하여 제 92항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 인간 CD19와 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 생성 방법.

청구항 94

제 89항 및 제 90항의 분리된 핵산에 의해 암호화되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 95

제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편 및 약학적으로 허용 가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)를 포함하는 조성물.

청구항 96

치료제(therapeutic agent)에 연결된 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 포함하는 면역접합체(immunoconjugate).

청구항 97

제 96항의 면역접합체 및 약학적으로 허용 가능한 운반체를 포함하는 조성물.

청구항 98

종양 세포(tumor cell)의 성장을 억제할 수 있는 유효량의 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 세포와 접촉(contacting)시키는 것을 포함하는, CD19를 발현하는 종양 세포의 성장 억제 방법.

청구항 99

제 98항에 있어서, 상기 종양 세포는 인간 버킷 림프종 세포(human Burkitt lymphoma cells), 인간 B 세포 선구체 백혈병 세포(human B cell precursor leukemia cells), 인간 B 세포 백혈병 세포(human B cell leukemia cells) 또는 인간 B 세포 림프종 세포(human B-cell lymphoma cells)로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, CD19를 발현하는 종양 세포의 성장 억제 방법.

청구항 100

개체(subject)로부터 B 세포를 고갈시키는 유효량의 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체로부터 B 세포 고갈 방법.

청구항 101

치료적으로 유효량의 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 치료적으로 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 CD19 매개 질환(CD19 mediated disorder)의 치료 방법.

청구항 102

제 101항에 있어서, 상기 CD19 매개 질환은 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis)을 포함한 자가면역 질환(autoimmune disorders), 암(cancer), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemias; ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemias; CLL), 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemias), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 악성 거대 세포 림프종(anaplastic large-cell lymphomas; ALCL), 피부 T 세포 림프종(cutaneous T-cell lymphomas), 혹 작은 절단 세포 림프종(nodular small cleaved-cell lymphomas), 말초 T 세포 림프종(peripheral T-cell lymphomas), 레네르트 림프종(Lennert's lymphomas), 면역아세포 림프종(immunoblastic lymphomas), T 세포 백혈병/림프종(T-cell leukemia/lymphomas; ATLL), 성인 T 세포 백혈병(adult T-cell leukemia; T-ALL), 엔트로블라스틱/센트로블라스틱 여포 림프종 암[entroblastic/centrocytic(cb/cc) follicular lymphomas cancers], B 계통의 범발성 거대 세포 림프종(diffuse large cell lymphomas of B lineage), 혈관면역아세포성 림프절증-같은 T 세포 림프종(angioimmunoblastic lymphadenopathy; AILD-like T cell lymphoma), HIV와 관련된 체강에 근거한 림프종(HIV associated body cavity based lymphomas), 태아 상피성암(Embryonal Carcinomas), 리노-파린스의 미분화 상피성암(undifferentiated carcinomas of the rhino-pharynx) [예를 들면, 쉬민케 종양(Schmincke's tumor)], 캐슬맨 질병(Castleman's disease), 카포시 육종(Kaposi's Sarcoma), 다발성 골수종(multiple myeloma), 발턴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 항-CD20 항체 내성 B 세포 암(anti-CD20 antibody resistant B-cell cancers) 및 다른 B 세포 림프종(B-cell lymphomas) 및 백혈병(leukemias)으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 개체 내 CD19 매개 질환(CD19 mediated disorder)의 치료 방법.

청구항 103

제 101항에 있어서, 상기 CD19 매개 질환은 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemias; ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemias; CLL), 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemias), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루푸스

(systemic lupus erythematosus; SLE), 및 항-CD20 항체 내성 B 세포 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 개체 내 CD19 매개 질환(CD19 mediated disorder)의 치료 방법.

청구항 104

제 101항에 있어서, 상기 CD19 매개 질환은 종양 형성 질환(tumorigenic disorder)인 것을 특징으로 하는, 개체 내 CD19 매개 질환(CD19 mediated disorder)의 치료 방법.

청구항 105

약제(medicament)로서 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 용도.

청구항 106

CD19 매개 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 용도.

청구항 107

약제로 사용하기 위한 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 108

CD19 매개 질환의 치료를 위한 방법에 사용하기 위한 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편.

청구항 109

CD19 매개 질환의 치료를 위한 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 제 95항 또는 97항의 조성물 또는 제 96항의 면역 집합체를 포함하는 제조 물품(article of manufacture).

청구항 110

CD19 매개 질환의 치료를 위한 제 1항 내지 제 72항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 제 95항 또는 97항의 조성물 또는 제 96항의 면역 집합체를 포함하는 키트(kit).

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 CD19(human CD19)에 결합하는 인간화된 항체(humanized antibody) 또는 그것의 단편(fragment)에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄(heavy chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR3; 및/또는 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄(light chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR3로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] B 세포 표면 마커(B cell surface marker)는 일반적으로 B 세포 질환(disorder) 또는 질병(disease), 자가면역 질병(autoimmune disease), 및 이식 거부(transplantation rejection)의 치료를 위한 표적으로서 제시되어 왔다. B 세포 표면 마커는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, 및 CD86 백혈구 표면 마커(leukocyte surface markers)를 포함한다. 특정 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체(antibody)는 개발되어 왔고, 그 일부는 질병 및 질환의 치료를 위해 검사되고 있다.
- [0003] 예를 들면, 직접적으로 성숙한 B 세포(mature B cell) 및 그들의 악성 대응물(malignant counterpart)에 특이적인 CD20 세포 표면 분자에 대한 키메라의(chimeric) 또는 방사선 표지의 단일클론 항체(monoclonal antibody; mAb)를 바탕으로 하는 치료법(therapy)는 생체 내에서 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)의 치료에 효과적인 것으로 나타났다[Tedder et al, Immunol. Today 15:450-454 (1994); Press et al, Hematology, 221-240 (2001); Kaminski et al, N. Engl. J. Med., 329:459-465 (1993); Weiner, Semin. Oncol, 26:43-51 (1999); Onrust et al, Drugs, 58:79-88 (1999); McLaughlin et al, Oncology, 12:1763-1769 (1998); Reff et al, Blood, 83:435-445 (1994); Maloney et al, Blood, 90:2188-2195 (1997); Maloney et al, J. Clin. Oncol, 15:3266-3274 (1997); Anderson et al, Biochem. Soc. Transac, 25:705-708 (1997)]. 항-CD20 단일클론 항체 치료법 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 특발 혈소판감소 자색반증(idiopathic thrombocytopenic purpura) 및 용혈성 빈혈(hemolytic anemia) 뿐만 아니라 면역에 관련된 다른 질병의 징후(manifestations)를 개선(amelioration)시키는 것이 밝혀졌다[Silverman et al, Arthritis Rheum., 48:1484-1492 (2002); Edwards et al, Rheumatology, 40:1-7 (2001); De Vita et al, Arthritis Rheumatism, 46:2029-2033 (2002); Leandro et al, Ann. Rheum. Dis., 61:883-888 (2002); Leandro et al, Arthritis Rheum., 46:2673-2677 (2001)]. 항-CD22 단일 클론 항체 LL-2는 화학 요법 치료를 받고 있는 공격적이고 재발된 림프종(lymphoma) 환자를 치료하는데 효과적인 것이 보여졌다(Goldenberg 특허 Nos: 6,134,982 및 6,306,393). 항-CD20(IgG1) 항체인 리투산(RITUXANTM)은 성인 면역 혈소판감소 자색반증(adult immune thrombocytopenic purpura), 류머티스성 관절염, 및 자가면역 용혈성 빈혈과 같은 특정 질병의 치료에서 성공적으로 사용되어왔다(Cured et al, WO 00/67796). 상기 치료의 효과성에도 불구하고, 대부분의 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemias; ALL) 및 다른 많은 B 세포 악성 종양(malignancy)은 CD20 면역 치료법(CD20 immunotherapy)후에 CD20을 발현하지 않거나, CD20을 낮은 수준으로 발현하거나, 또는 CD20의 발현이 손실되었다[Smith et al, Oncogene, 22:7359-7368 (2003)]. 또한, 비호지킨 림프종 환자의 절반만이 CD20에 직접적인 면역 치료법에 반응하기 때문에 CD20의 발현은 항-CD20 치료법에 대한 반응으로 예측할 수 없다.
- [0004] 인간 CD19(human CD19) 분자는 인간 B 세포의 표면에서 발현되는 구조적으로 구별되는 세포 표면 수용체(receptor)이며, 상기 인간 B 세포는 전-B 세포(pre-B cells), 초기 발달의 B 세포(B cells){즉, 미성숙 B 세포(immature B cells), 말단 분화(terminal differentiation)을 통한 형질 세포(plasma cell)로 되는 성숙 B(mature B cells), 및 악성 B 세포(malignant B cells)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. CD19는 대부분의 전-B 세포 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemias; ALL), 비호지킨 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemias; CLL), 프로-림프구성 백혈병(pro-lymphocytic leukemias), 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemias), 일반 급성 림프구성 백혈병(common acute lymphocytic leukemias), 및 일부 null-급성 림프구성 백혈병에 의해 발현된다[Nadler et al, J. Immunol., 131:244-250 (1983), Loken et al, Blood, 70:1316-1324 (1987), Uckun et al, Blood, 71:13-29 (1988), Anderson et al, 1984. Blood, 63:1424-1433 (1984), Scheuermann, Leuk. Lymphoma, 18:385-397(1995)]. 나아가 형질 세포의 CD19 발현은 다발성 골수종(multiple myeloma), 형질세포종(plasmacytomas), 발던스트롬 종양(Waldenstrom's tumor)와 같은 분화된 B 세포 종양에서도 발현할 수 있다는 것을 의미한다[Grossbard et al., Br. J. Haematol, 102:509-15(1998); Treon et al, Semin. Oncol, 30:248-52(2003)].
- [0005] 또한, CD19 항원(antigen)은 면역치료법을 위해 제안된 많은 표적 중에 하나이다. CLB-CD19 항체(항-CD19 쥐

IgG2a mAb)는 흉선(thymus)이 없는 쥐(athymic mice)에 이식한 인간 종양의 성장을 억제하는 것이 보여졌다[Hooijberg et al, Cancer Research, 55:840-846 (1995)]. 다른 연구에서는, 단일 클론 쥐(murine) 항체 FMC63(IgG2a)가 인간 IgG1 Fc 부위를 사용하여 키메라화(being chimerized)되었다[Zola et al, Immunol Cell Biol 69:411-22 (1991)]. 상기 항체는 시험관 내에서(in vitro) 보체(complement)에 매개되는 세포독성 또는 ADCC를 유도하지 않았고, 인간 B 세포 림프종(human B cell lymphoma)를 갖고 있는 SCID 쥐(xenotransplantation model)은 중간의(moderate) 그러나 이식된 종양세포의 비 특이적인 사멸을 초래한다[Pietersz et al, Cancer Immunol. Immunother., 41:53-60 (1995)].

[0006] 종양 주입(implantation)의 이중이식 쥐 모델(xenotransplantation mouse model)을 사용하여 얻어진 결과는 쥐 항-CD19 항체를 환자(인간)에게 사용하는 연구에 이르게 하였다. 상기 쥐 CLB-CD19 항체는 이전의 보편적인 치료법(화학요법 또는 방사선요법)을 실패한 진행성 비호지킨 림프종으로 진단받은 6명의 환자에게 투여되었다. 상기 환자들은 전체 225 내지 1000mg의 범위의 농도에서 항체를 투여받았다[Hekman et al, Cancer Immunol. Immunotherapy, 32:364-372 (1991)]. 항체 투입(infusion) 후, 비록 순환하는 종양세포는 두 명의 환자에서 일시적으로 감소하였으나, 항체 치료의 두 기간(period) 후에 오직 한 명의 환자만이 부분적 차도(partial remission)를 보였다. 치료 효험(therapeutic efficacy)에 관하여 어떠한 결론도 상기 난치병 환자의 작은 군으로부터 도출될 수 없었다.

[0007]

[0008] 그 후에, 상기 조사자들은 이식 모델에서 결합되지 않은(unconjugated) CD20 mAb의 항-종양효과가 CD19 mAb의 것보다 매우 월등하다는 것을 보였다[Hooijberg et al, Cancer Res., 55:840-846 (1995); 및 Hooijberg et al, Cancer Res., 55:2627-2634 (1995)]. 또한, 그들은 CD19 및 CD20 mAb 함께 사용하였을 때, 종양 발생에 있어서 추가 또는 상보적(synergistic) 효과를 관찰하지 못했다[Hooijberg et al, Cancer Res., 55:840-846 (1995)]. 비록 이중이식 동물 모델은 인간에게 있어 효험에 대한 상당히 좋지 않은 진단 지표(poor prognostic indicator)로 인식되었지만, 이러한 동물 연구에서 얻은 상기 부정적 결과(negative result)는 어떤것도 결합되지 않은(naked) 항-CD19 항체를 이용한 치료법에 대한 관심을 감소시켰다.

[0009] 항-CD19 항체를 기초로 한 면역독소(immunotoxin)의 용도는 동등한 부정적 결과를 나타냈다. 초기 임상 시도(clinical trial)에서, B4 항-CD19 항체(쥐 IgG1 mAb)를 식물독소 리신(ricin)과 결합시키고 이전의 보편적인 치료법에서 실패한 다발성 골수종[Grossbard et al., British Journal of Haematology, 102:509-515(1998)], 진행성 비호지킨 림프종[Grossbard et al, Clinical Cancer Research, 5:2392-2398 (1999)], 및 불치성 B 세포 악성 종양(refractory B cell malignancy) [Grossbard et al, Blood, 79:576-585 (1992)]를 가진 인간 환자에게 투여하였다. 상기 시도는 일반적으로 인간에게 B4-리신 결합체 투여의 안전성을 나타낸다; 하지만, 리투산(RITUXANTM)의 임상적 시도와 비교했을 때 결과들은 혼합되고 반응률(response rate)은 좋지 않았다[Grossbard et al, Clinical Cancer Research, 5:2392-2398 (1999)]. 또한, 환자의 상당한 부분(portion)이 인간 항-쥐 항체(human anti-mouse antibody; HAMA) 반응 또는 인간 항-리신 항체(human anti-ricin antibody; HARA) 반응을 발달시켰다.

[0010]

[0011] 아무것도 결합시키지 않은(naked) 항-CD19 항체 또는 항-CD19 항체에 근거한 면역독소를 사용하는 현재 치료법은 동등한 부정적 결과를 나타냈기 때문에, CD19 매개 질환을 치료하기 위해 보다 효과적인 항-CD19 항체, 예를 들면 세포자멸사(apoptosis) 및 B 세포의 증식의 차단을 초래함으로써, 및 ADCC를 통해 사멸(killing)을 매개함으로써 효과적으로 종양 세포의 죽음(death)을 유도할 수 있는 항-CD19 항체를 개발시켜야 하는 필요성이 있다.

발명의 내용

[0012] 본 발명의 개요

[0013] 본 발명은 일반적으로 인간 CD19(human CD19)에 결합하는 인간화된 항체(humanized antibodies) 또는 그것의

단편(fragment), 그것의 제조 방법 및 CD19 매개 질환을 치료하기 위한 방법을 포함하는 용도에 관한 것이다. 본 발명의 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그의 단편은 예를 들면 ADCC 활성, 세포자멸사(apoptosis) 유도 및 B 세포의 증식(proliferation)의 억제를 포함하는 많은 바람직한 특성을 나타낸다.

- [0014] 한 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄(heavy chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR3로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄(light chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR3으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄(heavy chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR3; 및/또는 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄(light chain) CDR1, 및/또는 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR3로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화 항체 또는 그것의 단편에 관한 것이다.
- [0016] 또 다른 한 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 19, 20, 21, 22, 및 42로 구성된 군으로부터 선택되는 가변 부분 서열(variable region sequence)인 중쇄로 구성되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 V3-33*01(서열 번호: 11), V3-11*01(서열 번호: 12), V3-30*-18(서열 번호: 13) 및 V3-48*01(서열 번호: 14)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래된 형태 또는 그 유전자의 생산물인 가변 구조 부분(variable framework region) 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부분 서열(light chain variable region sequence)로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 V1-5*03(서열 번호: 3), V1-27*01(서열 번호: 4), V1-39*-01(서열 번호: 5) 및 V1-12*01(서열 번호: 6)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래된 형태 또는 그 유전자의 생산물인 경쇄 가변 구조 부분(light chain variable framework region)으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 및 55로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부분(heavy chain variable region)으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 및 63로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부분으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다:
- [0023] (a) 서열 번호: 64의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열; 및
- [0024] (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열.
- [0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다:
- [0026] (a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열; 및
- [0027] (b) 서열 번호: 67의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을

제공한다:

- [0029] (a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열; 및
- [0030] (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열.
- [0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 중쇄 및/또는 경쇄 불변 부위(constant region)로 구성되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기에서 상기 인간 중 불변 부위(human heavy constant region)는 인간 IgG1의 CH1, 인간 IgG1 연결부위(hinge) 및 인간 IgG3의 Fc 부위로 구성된 아형 변이(isotypic variant)로 구성된다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 모 항체(parent antibody)의 인간 IgG Fc 부위와 관련된 최소한 한 개의 아미노산 변형으로 구성된 변이 인간 IgG Fc 부위(variant human IgG Fc region)로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하는 반면, 변이 인간 IgG Fc 부위로 구성된 항체는 모 항체와 비교했을 때, 변형된 작용기 기능(effector function)을 나타낸다. .
- [0033] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기서 항체는 모항체의 324번 위치에 있는 아미노산에서 세린(serine; S)을 아스파라긴(asparagine; N)으로 대체한 아미노산 치환(substitution) S324N로 구성된 변이 인간 IgG Fc 부위로 구성되는 반면, 상기 변이 인간 IgG Fc 부위로 구성된 항체는 모 항체와 비교했을 때, 개선된 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)를 보인다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 라지 종양 세포(Raji tumor cell)와 결합, 50nM 또는 그 이하의 친화력(affinity; Kd)으로 인간 CD19와 결합, 그 상응하는 키메라 항체(chimeric antibody)의 CD19 결합 친화력(Kd)의 최소 20% 보유, 50nM 또는 그 이하의 친화력(Ki)으로 라지 종양 세포와 결합을 위해 경쟁, 라지 세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도, 라지 종양 세포에서 ADCC 활성화, 악성 B 세포의 증식 억제하여 혈액에서 B 세포의 고갈(depletion)을 초래, 라지 종양 세포로의 내재화(internalization) 및 65°C 이상의 온도에서 FAB 단편의 열적 안정성(thermostability)등 다양한 바람직한 특성을 가진 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그의 단편을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 암호화하는 분리된 핵산(nucleic acid), 벡터(vector) 및 핵산 또는 벡터로 구성된 숙주 세포(host cell)를 제공한다. 또한, 인간화된 항체 또는 그것의 단편으로 구성된 조성물 또는 약학적으로 허용 가능한 전달체(carrier) 및 치료제(therapeutic agent)와 연결되어 인간화된 항체 또는 그의 단편으로 구성된 면역접합체(immunoconjugates)를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 CD19 매개 질환을 치료하기 위한 방법, CD19를 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하는 방법 및 상기 치료를 위해 개체(subject)에서 B 세포를 고갈시키는 방법을 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 키트(kit) 및 인간화된 항체 또는 그것의 단편으로 구성된 제조 물건(articles), CD19 매개 질환(CD19 mediated disorder)을 치료하기 위한 조성물 또는 면역접합체를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1의 A 및 도 1의 B는 라지 종양세포(Raji tumor cell)에서 인간 수용체 항체 구조(human acceptor antibody frameworks)로 이식된 FMC63-CDRs의 결합 활성도(binding activity)를 결정하기 위해 세포 유동 분석(flow cytometry analysis)을 나타내는 그림이다.

도 2의 A 및 도 2의 B는 FMC63의 경쇄(light chain, A) 또는 중쇄(heavy chain, B) 가변 부위를 VBASE2로부터 선택된 배선 구조(germline framework) 및 CDR-이식 공여자-증폭된 구조와 함께 일렬로 배열시킨 것(alignment)을 나타내는 그림이다. 카바트 넘버링(Kabat numbering)이 사용되었고 하기 넘버링 행(numbering row)에 나타난다.

도 3은 유동 세포분석법을 이용하여 SU-DHL-6 인간 B 세포 림프종 세포(human B cell lymphoma cells)에서 인간화 항체의 결합 활성도(binding activity)를 나타내는 그림이다.

도 4의 A 및 도 4의 B는 인간화 항-CD19 항체(humanized anti-CD19 antibodies)의 스캐차드 분석 곡선을 나타내는 그림이다. 분석은 유로폼으로 표지한 항체(europium-labelled antibodies)를 이용하여 라지 종양 세포

(Raji tumor cell)에서 수행되었다.

도 5의 A 및 도 5의 B는 라지 종양 세포에서 인간화된 항-CD19 항체의 ADCC 활성도를 나타내는 그림이다.

도 6은 라지 종양 세포에서 인간화된 항-CD19 항체의 세포자멸사(apoptosis)의 유도를 나타낸 그림이다.

도 7의 A는 인간화된 항-CD19 항체에 의해 SU-DHL-6 인간 B 세포 림프종 세포(human B cell lymphoma cell)의 증식이 억제되는 것을 나타내는 그림이다. 도 7의 B는 인간화된 항-CD19 항체를 처리한 후 라지 종양 세포의 클론형성능력(clonogenicity)을 나타내는 그림이다.

도 8은 라지 종양 세포에서 항-CD19 항체의 내재화를 나타내는 그림이다. 상기 내재화는 사포린이 결합된 2차 항체(saporin-conjugated secondary antibody, Hum-ZAP)에 의해 모니터 되었다.

도 9는 항-CD19 항체 야생형(wild type) VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A와 비교했을 때, S324 위치 돌연변이(mutant)의 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)을 나타내는 그림이다: (1)IgG1 대조군 항체(control antibody); (2)VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (3)VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4)VH16 R94K/S324G-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5)VH16 R94K/S324A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6)VH16 R94K/S324V-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (7)VH16 R94K/S324L-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (8)VH16 R94K/S324I-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (9)VH16 R94K/S324P-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (10)VH16 R94K/S324T-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (11)VH16 R94K/S324C-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (12)VH16 R94K/S324M-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (13)VH16 R94K/S324Q-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (14)VH16 R94K/S324F-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (15)VH16 R94K/S324Y-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (16)VH16 R94K/S324W-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (17)VH16 R94K/S324R-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (18)VH16 R94K/S324D-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (19)혈청(serum) 단독.

도 10은 E269, S298 및 S324의 위치에서 항-CD19 항체 변이(anti-CD19 antibody variant)의 CDC 검사(assay)를 나타내는 그림이다: (1)음성 대조군(negative control)-항체 없음(no antibody); (2)IgG1 대조군 항체(control antibody); (3)VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4)VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5)VH16 R94K/S298A/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6)VH16 R94K/E269D/S298A/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

도 11은 선택된 항-CD19 항체 변이의 세포에 의한 ADCC 검사(cell-based ADCC assay)를 나타내는 그림이다: (1)음성 대조군-항체 없음; (2)IgG1 대조군 항체; (3)VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4)VH16 R94K/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5)VH16 R94K/E269D/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

도 12는 항-CD19 항체 변이의 세포에 의한 CDC 검사를 나타내는 그림이다: (1)IgG1 대조군 항체; (2)VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (3)VH16 R94K (I133)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4)VH16 R94K/K274Q-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5)VH16 R94K/N276K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6)VH16 R94K/K334R-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (7)VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (8)VH16 R94K/K274Q/N276K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (9)VH16 R94K/K274Q/N276K/K334R-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (10)음성 대조군-항체 없음-혈청 없음; (11)음성 대조군-혈청 단독.

도 13은 탈푸고실화된 항-CD19 항체 변이(defucosylated anti-CD19 antibody variants)의 세포에 의한 ADCC 검사를 나타내는 그림이다: (1)음성 대조군-항체 없음; (2)IgG1 대조군 항체; (3)VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4)VH16 R94K (shRNA)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5)VH16 R94K (GNTIII)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6)VH16 R94K/E269D/S298A (shRNA)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (7)VH16 R94K/E269D/S298A (GNTIII)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

도 14는 SCID 쥐(mouse)의 비장(spleen)에서 검출된 항-CD19 항체 변이에 의한 B 세포 고갈(B cell depletion) (전체 B 세포의 ACN)을 나타내는 그림이다: (1)음성 대조군-인간 PBMC(human PBMC) 없음; (2)인간 PBMC-허셉틴(Herceptin®); (3)인간 PBMC-맵테라(Mabthera®); (4)인간 PBMC-VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5)인간 PBMC-VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

도 15는 SCID 쥐의 비장에서 검출된 항-CD19 항체 변이에 의한 B 세포 고갈(전체 B 세포의 비율)을 나타내는 그림이다: (1)음성 대조군-인간 PBMC 없음; (2)인간 PBMC-허셉틴 (3)인간 PBMC-맵테라 (4)인간 PBMC-VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5)인간 PBMC-VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명은 CD19에 결합하는 인간화된 항체 및 그것의 단편에 관한 것이다.

[0040] 여기에서 사용되는 "인간 CD19(human CD19)"라는 용어는 변이(variant), 아형(isoform), 및 인간 CD19의 종 상동체(species homologs)를 포함한다. 따라서, 본 발명의 인간화된 항체는 특정 경우에 인간이 아닌 다른 종(species)의 CD19와 교차 반응(cross-reactivity)을 할 수도 있다. 어떤 실시예에서는, 항체는 하나 또는 그 이상의 인간 CD19 단백질에 대해 완전히 특이적일 수 있고 종(species) 또는 다른 종류의 비인간 교차반응성(non-human cross-reactivity)을 나타내지 않을 수도 있다. 인간 CD19의 예시적인 완전한 아미노산 서열은 스위스프로트 액세스 넘버(SwissProt accession number) P 15391 (서열 번호: 125)을 갖는다. 또한, CD19는 B 세포 표면 항원(antigen) B4, B 세포 항원 CD19, CD19 항원, 및 Leu-12로 알려져 왔다. 인간 CD19는 엔트레즈진(Entrez Gene)에 의해 유전자ID(geneID): 930, HGNC에 의해 HGNC: 1633로 지정되었다. CD19는 지정된 CD19의 유전자에 의해 암호화 될 수 있다. 여기서 "인간 CD19"의 사용은 모든 알려진 또는 아직 발견되지 않은 대립형질 유전자(alleles) 및 CD19의 다형체(polymorphic form)를 포함한다. 여기에서 사용되는 "CD19"의 용어는 따로 구체적으로 명시되지 않으면 "인간 CD19"를 의미한다.

[0041]

[0042] 여기에서 사용되는 "인간 CD19에 결합하는 항체"라는 용어는 항체, 바람직하게는 인간 CD19에, 예를 들면 친화력(Kd) 500nM 또는 그 이하, 바람직하게는 100nM 또는 그 이하, 보다 바람직하게는 50nM 또는 그 이하를 갖는 라지 종양 세포 DSMZ ACC319와 같이 라지 종양 세포(Raji tumor cell)의 표면에 발현되어 있는 CD19에 결합하는 IgG 항체를 포함한다.

[0043] 여기에서 사용되는 "B 세포(B cell)" 또는 "B 림프구(B lymphocyte)"는 골수(bone marrow)에서 발달되어 피 또는 림프(pymph)에서 순환하고, 체액성 면역(humoral immunity)을 제공하는 림프구(lymphocytes)의 한 종류를 의미한다. B 세포는 유리 항원(free antigen)을 인식하고, 항원을 비활성화시키는 면역 글로불린(항체)을 분비하는 형질세포(plasma cell)로 분화 또는 성숙한다. 또한, 그 후 상기 항원을 만나면 특정 면역 글로불린(항체)을 만드는 기억 세포(memory cell)도 생성된다. 또한, B 세포는 랑게르한스의 소도(islet of Langerhans)에서 "베타 세포(Beta cell)"로 알려져 있다.

[0044]

[0045] 여기서 사용하는 "항체(antibody)"라는 용어는 모든 항체를 포함하고 어떠한 항원일지라도 그 항원에 결합하는 단편 또는 단일사슬(single chain)을 포함한다. "항체"는 이황화결합(disulfide bond)로 상호연결(interconnected)된 최소한 두 개의 중쇄(heavy chain; H) 및 두 개의 경쇄(light chain; L), 또는 그것의 항원 결합 단편으로 구성된 당단백질(glycoprotein)을 의미한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 부위(VH로 약자 사용) 및 중쇄 불변 부위(constant region)로 구성되어 있다. 중쇄 불변 부위는 세가지 도메인(domain), CH1, CH2 및 CH3으로 구성되어 있다. 각 경쇄(light chain)는 경쇄 가변 부위(VL로 약자 사용) 및 경쇄 불변 부위로 구성되어 있다. 경쇄 불변 부위는 한 개의 도메인, CL로 구성되어 있다. VH 및 VL 부위는 나아가 과변이 부위(region of hypervariability)로 작게 나누어 질 수 있는데, 이것을 상보성 결정 부위(complementarity determining region; CDR)이라고 하며, 이것은 더욱 불변하는(일정한, conserved) 부위인 구조 부위(frame region; FR 또는 FW)사이에 배치되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 세 개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되어 있고, 이것은 아미노-말단(amino-terminus)에서 카복실-말단(carboxyl-terminus)로 하기의 순서에 따라 정렬되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 부위는 항원과 상호작용하는 결합 도메인(binding domain)을 포함한다. 항체의 불변 부위는 면역 시스템(immune system) [(예를 들면 작용기 세포(effector cells)] 및 고전적 보체 시스템(classical complement system)의 첫 번째 구성요소(C1q)를 포함하는 다양한 세포를 포함하는 숙주 조직(tissue) 또는 요인(factor)와 면역 글로불린(immunoglobulin)의 결합을 매개한다.

[0046] 여기서 사용하는 "키메라 항체(chimera antibody)"라는 용어는 가변 부위 서열이 한 종(species)로부터 유래되고 불변 부위 서열은 다른 종(species)에서 유래한 항체를 포함하고, 예를 들면 가변 부위 서열은 쥐(mouse) 항체에서 유래하고 불변 부위 서열은 인간 항체로부터 유래한 항체이다.

- [0047] 여기에서 사용되는 "인간화된 항체(humanized antibody)"라는 용어는 또 다른 포유류(mammalian species), 예를 들면 쥐의 배선(germline)으로부터 유래한 CDR 서열이 인간 구조 서열(human framework sequence)로 이식된 항체를 포함한다. 추가적인 구조 부위 변형(framework region modification)은 인간 구조 서열에서 뿐만 아니라 또 다른 포유류의 배선으로부터 유래한 CDR 서열에서도 형성될 수 있다.
- [0048] 여기에서 사용되는 "인간 항체(human antibody)"라는 용어는 항체의 구조(framework) 및 CDR 부위 모두 인간의 배선 면역 글로불린 서열으로부터 유래된 가변 부위를 갖는 항체를 포함한다. 또한, 만약 항체가 불변 부위를 포함한다면, 상기 불변 부위는 인간 배선 면역 글로불린 서열(human germline immunoglobulin sequences)로부터 유래된 것이다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 면역 글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다[예를 들면, 시험관 내 임의의(random) 또는 위치 특이적 돌연변이형성과정(site-specific mutagenesis in vitro)에 의한 또는 생체 내 체성 돌연변이(somatic mutation in vivo)에 의한 돌연변이], 그러나, 여기에서 사용되는 "인간 항체"라는 용어는 또 다른 포유류의 배선으로부터 유래된 CDR 서열을 갖는 항체를 포함하러 하지 않는다.
- [0049] 여기서 사용되듯이, 만약 항체의 가변 구조 부위(variable framework regions)가 인간 배선 면역 글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻어졌다면, 인간화된 항체는 특정 인간 배선 서열(인간 유전자)의 "생산물" 또는 그것으로부터 "유래된" 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위(variable framework regions)로 구성되어 있다. 상기 시스템은 관심 있는 항체(antigen of interest)로 면역화된 인간 면역 글로불린 유전자를 갖는 형질전환 쥐(transgenic mouse) 또는 페이지(phage)에 나타난 인간 면역 글로불린 유전자 라이브러리(library)를 관심 있는 항체로 스크리닝(screening)하는 것을 포함한다. 인간 배선 면역 글로불린 서열의 "생산물" 또는 그것으로부터 "유래된" 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위로 구성된 인간화된 항체는 인간화된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위의 아미노산 서열을 인간 배선 면역 글로불린의 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위의 아미노산 서열과 비교함으로써 동정 될 수 있다. 특정 인간 배선 면역 글로불린 서열의 "생산물"인 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위로 구성된 인간화된 항체는 특정 인간 배선 면역 글로불린의 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위와 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위를 갖는다. 특정 인간 배선 면역 글로불린 서열로부터 "유래된" 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위로 구성된 인간화된 항체는 특정 배선 서열의 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위와 비교하였을 때, 예를 들면 자연적으로 발생한 체성 돌연변이 또는 고의적인 위치-지향적 돌연변이(site-directed mutation)의 도입으로 인해 아미노산의 상이성을 가질 수 있다. 하지만, 선택된 인간화된 항체는 일반적으로 인간 배선 면역 글로불린의 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위에 의해 암호화된 아미노산 서열과 최소한 90%의 아미노산 상동성을 갖는 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위를 갖고, 다른 종[쥐 배선 서열(murine germline sequence)]의 배선 면역 글로불린 아미노산 서열과 비교하였을 때 인간으로부터 유래된 것으로서 인간화된 항체를 동정하는 아미노산 잔기를 포함한다. 특정 경우에, 인간화된 항체는 배선 면역 글로불린 유전자에 의해 암호화된 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위의 아미노산 서열과 최소한 95% 상동성을 갖는 것이 선호될 수 있고, 보다 바람직하게는 최소한 96%, 가장 바람직하게는 최소 97%, 특정 경우에는 최소 98%, 가장 특징적으로는 최소 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위를 갖는다. 일반적으로, 특정 인간 배선 서열로부터 유래된 인간화된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위는, 인간 배선 면역 글로불린 유전자에 의해 암호화되는 중쇄 또는 경쇄 가변 구조 부위의 아미노산 서열에 대해, 10 이하의, 바람직하게는 5 개 이하의, 또는 보다 바람직하게는 4, 3, 2, 또는 1 이하의 상이성을 보인다.
- [0050]
- [0051] 여기에서 사용되는 "Fab" 또는 "Fab 부위"는 VH, CH1, VL, 및 CL 면역 글로불린 도메인(immunoglobulin domains)으로 구성된 폴리펩티드(polypeptides)를 포함한다. Fab은 분리된 상기 부위를 의미하거나 또는 전장(full-length)의 항체 또는 항체 단편(fragment)에서 상기 부위를 의미한다.
- [0052] 여기에서 사용되는 "Fc" 또는 "Fc 부위"는 면역 글로불린 도메인의 첫 번째 불변 부위를 제외한 항체의 불변 부위로 구성된 폴리펩티드를 포함한다. 따라서 Fc는 IgA, IgD, 및 IgG 면역 글로불린 도메인에서 끝에 있는 두 개의 불변 부위, 및 IgE 및 IgM 면역 글로불린 도메인에서 끝에 있는 세 개의 불변 부위, 및 상기 도메인들의 유동성 있는 연결 N-말단(hinge N-terminus)을 의미한다. IgA 및 IgM에서, Fc는 J 사슬(J chain)을 포함할 수도

있다. IgG에서, Fc는 면역 글로불린 도메인 C γ 2 및 C γ 3(C γ 2 및 C γ 3), 및 C γ 1(C γ 1) 및 C γ 2(C γ 2) 사이의 연결 부위(hinge)로 구성된다. 비록 Fc 부위의 경계(boundary)는 다양할 수 있지만, 상기 인간 IgG 중쇄 Fc 부위는 때때로 그것의 카복실-말단에서 C226 또는 P230 잔기로 구성된 것으로 정의되며, 여기서 넘버링(numbering)은 카바트(Kabat)에서 처럼 EU 인덱스(EU index)에 따른다. 인간 IgG1에서, 여기서 Fc 부위는 그것의 카복실-말단에서 P232 잔기로 구성된 것을 의미하고, 여기서 넘버링(numbering)은 카바트(Kabat)에서 처럼 EU 인덱스(EU index)에 따른다. Fc는 분리된 부분을 의미할 수 있고, 또는 Fc 폴리펩티드, 예를 들면 항체에서 상기 부분을 의미할 수도 있다.

[0053] 여기에서 "연결(hinge)" 또는 "연결부위(hinge region)" 또는 "항체 연결 부위(antibody hinge region)"는 항체의 첫 번째 및 두 번째 불변 도메인 사이의 아미노산으로 구성된 유동성이 있는 폴리펩티드(flexible polypeptide)를 포함한다. 구조적으로, IgG C1 도메인 말단은 EU 위치(position) 220에서 끝나고, IgG CH2 도메인은 EU 위치 237에서 시작한다. 따라서 IgG에 있어서 항체 연결 부위는 위치 221(IgG1에서 D221) 내지 231(IgG1에서 A231)을 포함하는 것으로 정의되며, 여기서 넘버링(numbering)은 카바트(Kabat)에서 처럼 EU 인덱스(EU index)에 따른다.

[0054]

[0055] 여기에서 사용되는 "모항체(parent antibody)" 또는 "모 면역 글로불린(parent immunoglobulin)"은 후에 변이(variant)를 생성하기 위해 변형되는 변형되지 않은 항체를 포함한다. 상기 모 항체는 자연적으로 발생한 항체, 또는 자연적으로 발생한 항체의 변이 또는 조작한 형태(engineered version)일 수 있다. 모항체는 항체 그 자체, 모 항체로 구성된 조성물, 또는 그것을 암호화하는 아미노산 서열을 의미할 수 있다. 여기서 사용되는 "모 항-CD19 항체(parent anti-CD 19 antibody)"는 인간 CD19에 결합하는 항체 또는 면역 글로불린을 의미하고, 변이(variant)를 생성하기 위해 변형(modification)될 수 있다.

[0056]

[0057] 여기에서 사용되는 "모의 항체(parental antibody)" 또는 "모의 면역 글로불린(parental immunoglobulin)"은 후에 인간화된 항체를 생성하기 위해 변형된 쥐 또는 키메라 항체(chimeric antibody)를 포함한다.

[0058] 여기서 사용되는 "변이 항체(variant antibody)" 또는 "항체 변이(antibody variant)"는 그 모 항체와 비교하였을 때, 최소한 한 개의 아미노산 변형에 의해 모 항체 서열의 것과 다른 항체 서열을 포함한다. 여기서 변이 항체 서열은 모 항체 서열에 대해, 바람직하게는 최소한 약 80%, 보다 바람직하게는 최소한 약 90%, 보다 더 바람직하게는 최소한 약 95% 아미노산 서열 상동성을 가질 것이다. 항체 변이는 여기서 변이 항체 서열은 항체 그 자체, 항체 변이로 구성된 조성물, 또는 그것을 암호화하는 아미노산 서열을 의미할 수 있다.

[0059] 여기서 "아미노산 변형(amino acid modification)"이란 용어는 폴리펩티드 서열에서 아미노산 치환(substitution), 삽입(insertion), 및/또는 결실(deletion)을 포함한다. 여기서 "아미노산 치환(amino acid substitution)" 또는 "치환(substitution)"은 모 폴리펩티드 서열(parent polypeptide sequence)의 특정 위치에서 아미노산이 다른 아미노산으로 대체되는 것을 의미한다. 예를 들면, 치환 R94K는 변이 폴리펩티드를 의미하는데, 이 경우에는 위치 94에서 아르기닌(arginine)이 리신(lysine)으로 대체된 중쇄 가변 구조 부위 변이를 의미한다. 상기 예시에서, 94K는 리신으로 위치 94에서의 치환을 가르킨다. 여기서 목적을 위해, 다중 치환(multiple substitution)은 일반적으로 슬래시(slash)에 의해 분리된다. 예를 들면, R94K/L78V는 R94K 및 L78V의 치환으로 구성된 이중 변이(double variant)를 의미한다. 여기서 사용되는 "아미노산 삽입(amino acid insertion)" 또는 "삽입(insertion)"은 모 폴리펩티드 서열의 특정 위치에서 아미노산의 첨가를 의미한다. 예를 들면, 삽입-94(insert-94)는 위치 94에서의 삽입을 의미한다. 여기서 사용되는 "아미노산 결실(amino acid deletion)" 또는 "결실(deletion)"은 모 폴리펩티드 서열의 특정 위치에서 아미노산 제거를 의미한다. 예를 들면 R94-는 위치 94에서 아르기닌의 결실을 의미한다.

[0060] 여기에서 사용하는 "보존적 변형(conservative modification)" 또는 "보존적 서열 변형(conservative sequence modification)"은 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성(binding characteristics)에 유의적으로 영향을

미치지 않거나 그것을 바꾸지 않는 아미노산 변형(amino acid modification)을 의미한다. 상기 보존적 변형은 아미노산 치환, 삽입 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에서 알려진 표준 기술(standard technique), 예를 들면 위치-지향 돌연변이형성(site-directed mutagenesis) 및 PCR-매개 돌연변이 형성(PCR-mediated mutagenesis)과 같은 것에 의해 본 발명의 항체에 도입될 수 있다.

[0061] 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 곁사슬(side chain)을 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 말한다. 유사한 곁사슬을 갖는 아미노산 잔기의 계(families of amino acid)는 당업계에서 정의되었다. 이러한 계(families)는 염기성(basic) 곁사슬[예를 들면, 리신(lysine), 아르기닌(arginine), 히스티딘(histidine)], 산성(acidic) 곁사슬[예를 들면, 아스파산(aspartic acid), 글루탐산(glutamic acid)], 이온화되지 않는 극성(uncharged polar) 곁사슬[예를 들면, 글리신(glycine), 아스파라긴(asparagine), 글루타민(glutamine), 세린(serine), 트레오닌(threonine), 티로신(tyrosine), 시스테인(cysteine), 트립토판(tryptophan)], 무극성(nonpolar) 곁사슬[예를 들면, 알라닌(alanine), 발린(valine), 루신(leucine), 이소루신(isoleucine), 프롤린(proline), 페닐알라닌(phenylalanine), 메티오닌(methionine)], 베타-가지친(beta-branched) 곁사슬[예를 들면, 트레오닌(threonine), 발린(valine), 이소루신(isoleucine)] 및 아로마틱(aromatic) 곁사슬[티로신(tyrosine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트립토판(tryptophan), 히스티딘(histidine)]을 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 부위에서 또는 구조(architecture) 부위에서 한 개 또는 그 이상의 아미노산 잔기는 동일한 곁사슬계(side chain family)로부터 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변형된 항체(variant antibody)는 남아 있는 기능을 위해 검사할 수 있다.

[0062] 본 발명에서 논의된 모든 면역 글로불린 중쇄 불변 부위 위치(position)에서, 넘버링은 카바트(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, incorporated entirely by reference)에서와 같이 EU 인덱스에 따른다. "카바트(Kabat)에서 EU 인덱스"는 Edelman et al., 1969, Biochemistry 63:78-85에 기술된 것과 같이, 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링(numbering)을 의미한다.

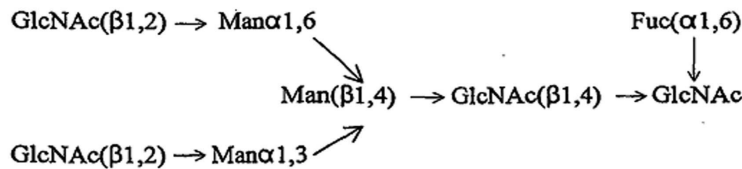
[0063] 여기에서 사용된 "전장 항체(full length antibody)"란 용어는 항체의 자연적인 생물학적 형태(natural biological form)으로 구성된 구조를 의미하며, 이것은 가변 부위 및 불변 부위를 포함한다. 예를 들면, 인간과 쥐를 포함한 대부분의 포유류에서, IgG 종류(class)의 전장 항체는 테트라머(tetramer)이고, 두 개의 면역 글로불린 사슬(chain)의 두 개의 동등한 쌍, 즉 한 개의 경쇄 및 중쇄를 갖는 각각의 쌍으로 구성되고, 이는 면역 글로불린 도메인 VL 및 CL으로 구성된 각각의 경쇄, 및 면역 글로불린 도메인 VH, CH1(C[감마]1), CH2(C[감마]2), 및 CH3(C[감마]3)으로 구성된다. 예를 들면, 몇몇 포유류의 경우, 낙타(camel) 및 라마(llamas)에서, IgG 항체는 단지 두 개의 중쇄로 구성될 수 있고, 각각의 중쇄는 Fc 부위에 결합한 가변 도메인으로 구성된다.

[0064] 항체 단편은, (i) Fab 및 Fab'-SH를 포함하는 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 Fab 단편, (ii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd의 단편, (iii) 단일 항체(single antibody)의 VL 및 VH 도메인으로 구성되는 Fv의 단편, (iv) 단일(single) 가변으로 구성되는 dAb 단편(Ward et al., 1989, Nature 341 :544-546), (v) Fab 단편이 연결되어 두 개로 구성된 2가의(bivalent) 단편인 F(ac')₂ 단편, (vi) VH 도메인 및 VL 도메인이 펩티드 링커(peptide linker)로 연결되어 두 개의 도메인이 항원 결합 위치(antigen binding site)를 형성하기 위해 결합된 단일 사슬 Fv 분자(scFv) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (vii) 이중특이적(bispecific) 단일 사슬 Fv 이량체(dimer) (PCT/US92/09965), (viii) 유전자 융합(gene fusion)에 의해 확립된 다가의(multivalent) 또는 다중특이적(multispecific) 단편인 "다이아바디(diabodies)" 또는 "트리아바디(triabody)"(Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; W094/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448) 및 (ix) 유전적으로 동일하거나 또는 상이한 항체와 융합된 scFv(Coloma & Morrison, 1997, Nature Biotechnology 15, 159-163)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0065] 항체는 불변 부위에 의해 유전적으로 결정되는 것에 따라 종류(class)로 군화되고, 또한 각각을 아형(isotype)이라고 한다. 인간 불변 경쇄는 카파(kappa; CK) 및 람다(lamda; C[lamda]) 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤(mu), 델타(delta), 감마(gamma), 알파(alpha), 또는 입실론(epsilon)으로 분류되고, 항체의 아형을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE로 정의한다. IgG 종류(class)는 가장 일반적으로 치료용으로 사용된다. 인간에서, 상기 종류는 아종류(subclass) IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 구성된다. 쥐에서는, 상기 종류가 아종류 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3로 구성된다. IgM은 IgM1 및 IgM2를 포함하는 아종류를 갖고 있으나, 이에 제한되지 않는다. IgA는 IgA1 및 IgA2를 포함하는 몇 개의 아종류를 갖고 있으나, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 여기에서 사용되는 "아형(isotype)"은 그들의 불변 부위의 화학적 및 항체의 특성에 의해 정의된 면역 글로불린의 종류 또는 아종류의 어떤 것을 의미한다. 알려진 인간 면역 글로불린 아형은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, 및 IgE이다.
- [0066] 여기서 사용되는 "ADCC" 또는 "항체 의존적 세포-매개 세포독성(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)"라는 용어는 Fc[감마]R(Fcgamma receptor)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포에 결합된 항체를 인식하여 표적 세포를 용해(lysis)시키는 세포-매개 반응을 포함한다. 다양한 관점에서, 향상된 ADCC 작용기 기능은 향상된 효능(potency) 또는 향상된 효험(efficacy)를 의미할 수 있다. 실험적 내용에서 사용되는 "효능(potency)"은 특정 치료효과가 관찰될 때 EC50(최대 효과적 농도의 절반), 항체의 농도를 의미한다. 실험적 내용에서 사용된 "효험(efficacy)"은 항체의 포화된 수준에서 최대 가능한 작용기 기능을 의미한다.
- [0067] 여기서 사용되는 "ADCP" 또는 항체 의존적 세포-매개 식세포작용(phagocytosis)은 Fc[감마]R을 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포에 결합된 항체를 인식하여 표적세포의 식세포작용을 초래하는 세포-매개 작용을 포함한다.
- [0068] 여기서 사용되는 "CDC" 또는 "보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity)"는 한 개 또는 그 이상의 보체 단백질 구성요소가 표적 세포의 용해(lysis)를 초래하는 반응을 포함한다.
- [0069] 여기서 사용되는 "작용기 기능(effector function)"은 항체 Fc 부위가 Fc 수용체(receptor) 또는 리간드(ligand)와의 상호작용으로부터 야기되는 생화학적 사건(event)을 포함한다. 작용기 작용은 ADCC 및 ADCP 같은 Fc[감마]R-매개 작용기 기능, 및 CDC 같은 보체-매개 작용기 기능을 포함한다.
- [0070] 여기서 사용되는 "개체(subject)"라는 용어는 어떤 인간 EH는 비인간 동물을 포함한다. "비인간 동물(nonhuman animal)"이란 용어는 모든 척추동물(vertebrates), 예를 들면 포유류 및 비인간 영장류(nonhuman primates), 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은 비포유류(non-mammals)를 포함한다. 바람직하게는, 개체는 인간이다.
- [0071] 여기서 사용되는 "아형 변이(isotypic variant)"는 하나의 아형(isotype)에서 최소한 한 개의 아미노산을, 바람직하게는 한 아형의 중쇄 불변 부위의 최소 한 개의 아미노산을 상이하고 배열된(aligned) 아형에서 상응하는 아미노산으로 바꾸는 아미노산 변형을 포함한다. 상기 아미노산 변형은 전체 불변 부위 면역 글로불린 도메인의 전환 또는, 바람직하게는 다른 아형에서 한 아형의 Fc 부위의 전환(conversion), 인간 IgG1 중쇄 불변 부위를 인간 IgG3의 Fc 부위로의 전환, 예를 들면 인간 IgG1의 CH1, 인간 IgG1의 연결 부위(hinge) 및 인간 IgG3의 Fc 부위로 구성되는 아형 변이를 야기시키는 전환으로 구성될 수 있다.
- [0072] 여기서 사용되는 "아형 변형(isotypic modification)"이란 용어는 한 아형의 한 개의 아미노산이 다른, 배열된 아형의 상응하는 아미노산으로의 전환하는 아미노산 변형을 포함한다. 예를 들면, 카바트 위치 296에서, IgG1은 티로신(tyrosine)을 갖고 있고 IgG2는 페닐알라닌(phenylalanine)을 갖고 있기 때문에, IgG2에서의

F296Y 치환은 아형 변형으로 간주된다.

[0073] "성숙한 핵심 탄수화물 구조(mature core carbohydrate structure)"는 하기도식화시켜 나타낸 것과 같은 이량 안테나의(biantennary) 올리고사카라이드(oligosaccharides)의 일반적인 탄수화물 구조 GlcNAc (Fucose)-GlcNAc-Man- (Man-GlcNAc)₂로 구성된 Fc 부위에 결합한 처리된 핵심 탄수화물 구조(processed core carbohydrate structure)를 포함한다:



[0074]

[0075] 상기 용어는 특별히 $\beta 1,2$ GlcNAc 잔기가 결여된 핵심의 성숙한 탄수화물 구조(core mature carbohydrate structure)의 G-1 형태를 포함한다. 하지만, 바람직하게는, 상기 핵심 탄수화물 구조는 $\beta 1,2$ GlcNAc 잔기를 포함한다. 여기서 성숙한 핵심 탄수화물 구조는 일반적으로 과만노실화(hypermannosylation)되지 않는다. 상기 성숙한 핵심 탄수화물 구조는 일반적으로 Fc 부위의 CH2 도메인의 Asn297와의 N-연결(N-linkage to Asn297)를 통해 당 단백질의 Fc 부위에 결합한다.

[0076] **항-CD19 항체(Anti-CD19 antibodies)**

[0077] 첫 번째 측면에서는, 본 발명은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR1, 및/또는 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3로 구성되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.

[0078] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR1, 및/또는 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3으로 구성되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.

[0079] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR1, 및/또는 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3; 및/또는 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR1, 및/또는 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2, 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3으로 구성되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다

[0080] 바람직하게는, 인간 19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR1, 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3 및/또는 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR1, 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3로 구성되어 있다. 더욱 바람직하게는, 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR1, 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3; 및 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR1, 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2 및 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3로 구성된다.

[0081] CDR1 및/또는 CDR2 도메인과는 독립적으로, CDR3 도메인은 단독으로 동족항원(cognate antigen)에 대한 항체의 결합 특이성(binding specificity) 결정한다는 것 및 공통적인 CDR3 서열에 근거하여 동일한 결합 특이성을 갖는 것 다수 항체(multiple antibody)가 가능하게 생성된다는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 하기의 것을 참조할 수 있다: Klimka et al, British J. of Cancer 83[pound]2):252-260 (2000)은 오직 쥐 항-CD30 항체 Ki-4의 중쇄 가변 도메인 CDR3를 사용한 인간화된 항-CD30 항체의 생성을 기술한다; Beiboer et al, J. Mol. Biol.

296:833-849 (2000)은 오직 모 쥐 MOC-31 항-EGP-2 항체(parental murine MOC-31 anti-EGP-2 antibody)의 중쇄 CDR3 서열을 사용한 재조합(recombinant) 상피 당단백질-2(epithelial glycoprotein-2; EGP-2) 항체를 기술한다; Rader et al, Proc. Natl Acad. Sci U.S.A. 95:8910-8915 (1998)는 쥐 항-인테그린[알파(alpha)]v[베타(beta)] 3 항체인 LM609의 중쇄 및 경쇄의 가변 CDR3 도메인을 사용한 인간화된 항-인테그린[알파]v[베타] 3 항체의 패널(panel)을 기술하였고, 상기 항체에서 각각의 항체는 CDR3 바깥쪽의 구별되는 서열로 구성되고, 모의 쥐 항체(parental murine antibody)와 동일한 에피토프(epitope)에 높은 또는 상기 모의 쥐 항체보다 더 높은 친화력으로 결합할 수 있다; Barbas et al, J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162 (1994)는 CDR3 도메인이 항원 결합에 가장 중요한 역할을 제공한다는 것을 기술하였다.

[0082] 따라서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 비인간 동물(non-human animal) 항체로부터의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 및 그것의 단편, 예를 들면 FMC63과 같이 쥐 항체로부터, 구체적으로 서열 번호: 29의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3 및/또는 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3로 구성된 항체를 제공하고, 여기에서 상기 항체는 CD19에 결합할 수 있다. 어떤 실시예에서는, 하나 또는 그 이상의 비인간 항체(non-human antibody)로부터의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 상기 발명의 항체는 (a) 결합하기 위해 경쟁할 수 있고; (b) 기능적 특징(functional characteristics)을 보유하며; (c) 동일한 에피토프(epitope)에 결합하고; 및/또는 (d) 상응하는 모의 비인간(parental non-human) 항체, 예를 들면 쥐 항체와 유사한 결합 친화력(binding affinity)을 가진다.

[0083]

[0084] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 19, 20, 21, 22 및 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위 서열, 바람직하게는 서열 번호: 21, 22 및 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위 서열, 보다 더 바람직하게는 서열 번호: 21로 구성된 중쇄 가변 부위 서열로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.

[0085] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 서열, 보다 더 바람직하게는 서열 번호: 25 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 서열, 보다 더 바람직하게는 서열번호 41로 구성된 경쇄 가변 부위 서열로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.

[0086] 어떤 실시예에서, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 19, 20, 21, 22, 및 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위 서열 및 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 서열, 보다 더 바람직하게는 서열 번호: 21, 22 및 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위 서열 및 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 서열, 보다 더 바람직하게는 서열 번호: 21, 22 및 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위 서열 및 서열 번호: 25 및 41로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 서열, 가장 바람직하게는 서열 번호: 21로 구성된 중쇄 가변 부위 서열 및 서열 번호: 41로 구성된 경쇄 가변 부위 서열로 구성된다.

[0087] 각각의 상기 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열은 인간 CD19에 결합할 수 있다는 것을 볼 때, 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열은 본 발명의 항-CD19 결합 분자(binding molecules)를 만들기 위해서 "혼합 및 매치(mixed and match)"될 수 있다. 상기 "혼합 및 매치"된 항체의 CD19 결합은 예를 들면 실시예에 기술된 결합 검사법(binding assay)를 이용하여 검사될 수 있다.

[0088] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 CD19에 결합할 수 있는 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 변이(variant)를 제공한다. 따라서 본 발명은 중쇄 또는 경쇄, 예를 들면 서열 번호: 21 또는 서열 번호: 41에 있는 각각 중쇄 또는 경쇄 가변부위 서열의 모 인간화된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 구조 부위의 아미노산 서열과 최소 80%의 상동성을 갖는(having at least 80% amino acid sequence identity) 중쇄 및/또는 경쇄 가변 구조 부위의 아미노산 서열을 갖는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 바람직하게, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 구조 부위의 아미노산 서열 상동성은 최소한 85%이고, 보다 바람직하게는 최소한 90%이며, 보다 더 바람직하게는 최소한 95%, 구체적으로 96%, 보다 구체적으로는 97%, 보다 더 구체적으로는 98%, 가장 구체적으로는 99%이고, 이것은 예를 들면 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 100%를 포함한다. 아미노산 서열에 대하여, 동일성(identity) 또는 상동성(homology)는,

최대 퍼센트 서열 동일성을 이루기 위하여, 필요하다면, 서열과 도입 갭(introducing gap)을 일렬로 배열(aligning)한 후, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편에 동일한 후보서열에서 아미노산 잔기의 비율(percentage)로서 정의된다. 따라서 서열 동일성은 두가지 폴리펩티드(polypeptide)의 아미노산의 위치에서 유사성을 비교하기 위해 일반적으로 사용되는 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 그들 각각의 아미노산(하나 또는 두 개 서열의 전장(full-length), 또는 하나 또는 두 개 서열의 미리 결정된 부분)의 최적 매치(optimal matching)을 위해 두가지 폴리펩티드를 일렬로 배열한다. 상기 프로그램은 디폴트 오프닝 페널티 및 디폴트 갭 페널티, 및 PAM250(표준 스코어링 매트릭스; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3 (1978)를 참조)과 같은 스코어링 매트릭스를 제공한다. 예를 들면, 퍼센트 상동성은 다음과 같이 계산될 수 있다: 두가지 서열을 일렬로 배열하여 비교하기 위해, 동일한 매치(match)의 총 수에 100을 곱하고 매치된 span에서 더 긴 서열의 길이의 합에 의해 나누어진 수 및 더 긴 서열로 도입된 갭(gap)의 수.

[0089] 어떤 실시예에서, 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기에서 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 19, 20, 21, 22 또는 42의 구조부위 서열에 대해 최소 80% 상동성을 갖는 중쇄 가변 구조 부위 서열 및/또는 서열 번호: 23, 24, 25, 26 및 41의 구조 부위 서열에 대해 최소 80% 상동성을 갖는 경쇄 가변 구조 부위 서열로 구성된다.

[0090] 어떤 실시예에서, 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기서 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 21, 22 또는 42의 구조 부위 서열에 대해 최소 80% 상동성을 갖는 중쇄 가변 구조 부위 서열 및/또는 서열 번호: 25 또는 41의 구조 부위 서열에 대해 최소 80% 상동성을 갖는 경쇄 가변 구조 부위 서열로 구성된다. 어떤 실시예에서, 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기서 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호:21의 구조 부위 서열에 대해 최소 80% 상동성을 갖는 중쇄 가변 구조 부위 서열 및/또는 서열 번호: 41의 구조 부위 서열에 대해 최소 80% 상동성을 갖는 경쇄 가변 구조 부위 서열로 구성된다.

[0091] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 것과 같은 중쇄 또는 경쇄 CDR로 구성되고 나아가 V3-33*01(서열 번호: 11), V3-11*01(서열 번호: 12), V3-30*-18(서열 번호: 13) 및 V3-48*01(서열 번호: 14)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래된 또는 인간 유전자의 생산물인 중쇄 가변 구조 부위, 바람직하게는 인간 유전자 V3-30*-18(서열 번호: 13) 또는 V3-48*01(서열 번호: 14)로부터 유래된 또는 그 유전자의 생산물인 중쇄 가변 구조 부위, 보다 더 바람직하게는 인간 유전자 V3-30*-18(서열 번호: 13)로부터 유래된 또는 그 유전자의 생산물인 중쇄 가변 구조 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 중쇄 가변 구조 부위는 그 인간 유전자로부터 유래된 또는 그 생산물에 존재하는 하나 또는 그 이상(예를 들면, 하나, 둘, 셋 및/또는 넷)의 중쇄 구조 부위 서열[예를 들면 구조 1(framework 1; FW1), 구조 2(framework 2; FW2), 구조 3(framework 3; FW3) 및/또는 구조 4(framework 4; FW4)]을 가질 수 있다. 바람직하게 중쇄 가변 부위 구조는 V3-33*01(서열 번호: 11), V3-11*01(서열 번호: 12), V3-30*-18(서열 번호: 13) 및 V3-48*01(서열 번호: 14)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래된 또는 그 생산물에 있는 FW1, FW2 및/또는 FW3, 보다 바람직하게는 FW1, FW2 및 FW3으로 구성된다. 여기에서 사용된 중쇄 구조 부위 서열은 FW1(위치 1 내지 위치 25), FW2(위치 36 내지 위치 49), FW3(위치 66 내지 위치 94) 및 FW4(위치 103 내지 위치 113)를 포함하고, 여기에서 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템(numbering system set forth)을 사용하여 명시된다.

[0092] 또 다른 측면에서 본 발명은 V1-5*03(서열 번호: 3), V1-27*01(서열 번호:4), V1-39*-01(서열 번호: 5) 및 V1-12*01(서열 번호: 6)로 구성된 군에서 선택된 인간 유전자로부터 유래된 또는 그 생산물인 경쇄 가변 구조 부위, 보다 바람직하게 V1-39*-01(서열 번호: 5)의 인간 유전자로부터 유래된 또는 그 생산물인 경쇄 가변 구조 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 경쇄 가변 부위 구조 부위는 그 인간 유전자로부터 유래된 또는 그 생산물에 존재하는 하나 또는 그 이상(예를 들면, 하나, 둘 셋 및/또는 넷)의 경쇄 구조 부위 서열[예를 들면 구조 1(framework 1; FW1), 구조 2(framework 2; FW2), 구조 3(framework 3; FW3) 및/또는 구조 4(framework 4; FW4)]로 구성될 수 있다. 바람직하게 경쇄 가변 부위 구조는 V1-5*03(서열 번호: 3), V1-27*01(서열 번호:4), V1-39*-01(서열 번호: 5) 및 V1-12*01(서열 번호: 6)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래된 또는 그 생산물에 존재하는 FW1, FW2 및/또는 FW3, 보다 바람직하게 FW1, FW2 및 FW3로 구성된다. 여기서 사용된 경쇄 구조 부위 서열은 FW1(위치 1 내지 위치 23), FW2

(위치n 35 내지 위치 49), FW3 (위치 57 내지 위치 88) 및 FW4 (위치 98 내지 위치 108)를 포함하고, 여기에서 아미노산 위치는 카바트에서의 넘버링 시스템 세트 4를 이용하여 명시된다.

[0093] 어떤 실시예에서, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 V3-33*01(서열 번호: 11), V3-11*01(서열 번호: 12), V3-30*-18(서열 번호: 13) 및 V3-48*01(서열 번호: 14)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래된 또는 그의 생산물인 중쇄 가변 구조 부위 및 V1-5*03(서열 번호: 3), V1-27*01(서열 번호: 4), V1-39*-01(서열 번호: 5) 및 V1-12*01(서열 번호: 6)로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래된 또는 그의 생산물인 경쇄 가변 구조 부위, 보다 바람직하게는 V3-30*-18(서열 번호: 13) 또는 V3-48*01(서열 번호: 14)의 인간유전자로부터 유래된 또는 그의 생산물인 중쇄 가변 구조 부위 및 인간 유전자 V1-39*-01(서열 번호: 5)에서 유래된 또는 그의 생산물인 경쇄 가변 구조 부위, 보다 더 바람직하게는 인간 유전자 V3-30*-18(서열 번호: 13)에서 유래된 또는 그의 생산물인 중쇄 가변 구조 부위 및 인간 유전자 V1-39*-01(서열 번호: 5)에서 유래된 또는 그의 생산물인 경쇄 가변 구조 부위로 구성된다.

[0094] 다른 인간 유전자로부터 유래된 또는 그 생산물에 존재하는 중쇄 가변 부위 구조 부위 및/또는 다른 인간 유전자로부터 유래된 또는 그의 생산물인 경쇄 가변 부위 구조 부위, 예를 들면 V3-48*01(서열 번호: 14)로부터 유래되거나 또는 그의 생산물에 존재하는 FW3과 결합한 V3-30*-18(서열 번호: 13)로부터 유래되거나 또는 그의 생산물에 존재하는 FW1 및 FW2, 및/또는 V1-12*01(서열 번호: 6)로 부터 유래되거나 또는 그의 생산물에 존재하는 FW3과 결합한 V1-39*-01(서열 번호: 5)로부터 유래되거나 또는 그의 생산물에 존재하는 FW1 및 FW2 도 본 발명에 포함된다.

[0095] 인간 중쇄 및 경쇄 가변 부위 유전자에 대한 배선(germline) DNA 서열은 인간 배선 서열 데이터베이스(database)인 "VBase"(인터넷 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 이용가능) 및 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; 및 Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germline VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836에서 찾을 수 있다. 또 다른 예로서, 인간 중쇄 또는 경쇄 가변 부위 유전자에 대한 배선 DNA 서열은 진뱅크 데이터베이스(Genbank database)에서 찾을 수 있다.

[0096] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기서 최소한 하나의 중쇄 CDR 및/또는 최소한 하나의 경쇄 CDR은 최소 하나의 아미노산 변형으로 구성된다. 위치-지향 돌연변이형성(site-directed mutagenesis) 또는 PCR-매개 돌연변이형성은 변형(modification)을 도입하기 위해 수행될 수 있고 항체 결합에 있어서 상기 효과 또는 관심 있는 다른 기능적 특징은 여기에서 기술되고 실시예에서 제공된 것처럼 시험관 내(in vitro) 또는 생체내(in vivo) 검사(assay)에서 평가될 수 있다. 상기 변형은 아미노산 치환, 첨가 또는 결실일 수 있지만, 바람직하게는 치환이다. 일반적으로, CDR 부위에서 일어나는 아미노산 변형은 5개를 초과하지 않고, 바람직하게는 4개를 초과하지 않고, 더욱 바람직하게는 세 개를 초과하지 않으며, 보다 더욱 바람직하게는 두 개를 초과하지 않고, 가장 바람직하게는 한 개를 초과하지 않는다.

[0097] 따라서 본 발명은 중쇄 CDR1 안에 있는 아미노산 치환 Y32F로 구성된 아미노산 변형, 및/또는 중쇄 CDR2 안에 있는 아미노산 치환 Y58F 또는 Y59F로 구성된 아미노산 변형 및/또는 중쇄 CDR3 안에 존재하는 Y96F, Y97F, Y98F 및 Y100_F로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환으로 구성된 아미노산 변형으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 바람직한 아미노산 변형은 중쇄 CDR1 안에 있는 아미노산 치환 Y32F로 구성된 아미노산 변형 및 중쇄 CDR3 안에 존재하는 Y96F, Y97F, Y98F 및 Y100_F로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환이다. 보다 바람직하게 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 아미노산 변형은 중쇄 CDR1 안에 있는 아미노산 치환 Y32F 및/또는 중쇄 CDR3 안에 있는 아미노산 치환 Y100_F이다.

[0098] 또한, 본 발명은 경쇄 CDR1 안에 있는 아미노산 치환 Y32F로 구성된 아미노산 변형 및/또는 경쇄 CDR3 안에 있는 N92A, T93A 및 T93V로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환으로 구성된 아미노산 변형으로 구성된 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 바람직한 아미노산 변형은 경쇄

CDR1 안에 있는 아미노산 치환 Y32F 및/또는 경쇄 CDR3 안에 있는 아미노산 치환 N92A이다.

[0099] 어떤 실시예에서, 본 발명은 중쇄 CDR1 안에 있는 아미노산 치환 Y32F으로 구성된 아미노산 변형, 및/또는 중쇄 CDR2 안에 있는 아미노산 치환 Y58F 또는 Y59F로 구성된 아미노산 변형 및/또는 중쇄 CDR3 안에 있는 Y96F, Y97F, Y98F 및 Y100F의 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환으로 구성된 아미노산 변형 및 경쇄 CDR1 안에 존재하는 아미노산 치환 Y32F으로 구성된 아미노산 변형 및/또는 경쇄 CDR3 안에 있는 아미노산 치환 92A, T93A 및 T93V로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환으로 구성된 아미노산 변형으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.

[0100] 어떤 실시예에서는, 변이 항체(variant antibody)를 제공하기 위해 구조 서열이 가변 부위를 조작하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 변이 항체는, 예를 들면 항체의 특성을 개선시키기 위해 변형이 VH 및/또는 VK 안의 구조 잔기(framework residue)에 대한 변형이 만들어진 것들을 포함한다. 일반적으로 상기 구조 변형은 항체의 면역원성(immunogenicity)을 감소시키기 위해 사용된다. 예를 들면, 한가지 접근은 그에 상응하는 쥐 서열에 대해 하나 또는 그 이상의 구조 잔기를 "복귀 돌연변이(back mutate)"시키거나 또는 그에 상응하는 배선 서열(germline sequence)에 대한 구조 잔기 하나 또는 그 이상을 "복귀 돌연변이(back mutate)"시키는 것이다.

[0101] 따라서 본 발명의 다른 측면은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하는데, 여기에서 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 중쇄 가변 부위의 구조 부위 중 최소한 하나는 상응하는 쥐 항체의 중쇄 가변 부위의 상응하는 구조 부위로부터의 최소 하나의 아미노산 변형으로 구성된다. 바람직하게 아미노산 변형은 아미노산 치환이다. 일반적으로 5개를 초과하지 않고, 보다 바람직하게는 4개를 초과하지 않으며, 보다 더 바람직하게는 세 개를 초과하지 않고, 그보다 더 바람직하게는 두 개를 초과하지 않으며, 가장 바람직하게는 한 개를 초과하지 않는 아미노산 변형이 구조 부위 안에서 수행된다.

[0102] 어떤 실시예에서, 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하는데, 여기에서 중쇄 가변 부위의 구조 부위의 구조 부위의 아미노산 변형은 37, 42, 48, 49, 67, 71, 78 및 94로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서의 아미노산 치환으로 구성된다. 중쇄 가변 부위의 구조 부위에서 바람직한 아미노산 치환은 42, 67, 71, 78 및 94로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 일어난다. 만약 아미노산 변형이 R94K라면 중쇄 가변 부위 서열은 서열 번호: 19 또는 서열 번호: 20 아니라는 단서하에 중쇄 가변 부위의 구조 부위에서 보다 바람직한 아미노산 치환은 G42R, F67L, R71K, L78V 및 R94K로 구성된 군으로부터 선택된 것이고, 반면에 R94K는 중쇄 가변 부위의 구조 부위에서 가장 바람직한 아미노산 치환이다.

[0103]

[0104] 또한 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하는데, 여기에서 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 경쇄 가변 부위의 구조 부위 중 최소한 하나는 그 상응하는 쥐 항체의 경쇄 가변 부위의 상응하는 구조 부위로부터의 최소 하나의 아미노산 변형으로 구성된다. 바람직한 아미노산 변형은 아미노산 치환이다. 일반적으로 5개를 초과하지 않고, 바람직하게는 4개를 초과하지 않으며, 보다 바람직하게는 세 개를 초과하지 않고, 보다 더 바람직하게는 두 개를 초과하지 않고, 가장 바람직하게는 한 개를 초과하지 않는 아미노산 변형이 구조 부위에서 일어난다. 어떤 실시예에서, 본 발명은 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하는데, 여기에서 경쇄 가변 부위 서열에서 구조 부위의 아미노산 변형은 44, 71 및 87로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서의 아미노산 치환으로 구성된다. 경쇄 가변 부위 서열에서 구조 부위의 보다 바람직한 아미노산 치환은 P44V, P44I, P44L, F71Y, F71H, F71S, F71T 및 Y87F로 구성된 군으로부터 선택된 것이다. 경쇄 가변 부위 서열에서 구조 부위의 가장 바람직한 아미노산 치환은 P44V, P44I, F71Y, 및 Y87F로 구성된 군에서 선택되는 것이고, 가장 바람직한 것은 P44Id1다.

[0105] 어떤 실시예에서, 본 발명의 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 상기 정해진 것과 같이, 중쇄 가변 부위 서열에서 구조 부위의 아미노산 변형으로 구성될 수 있고, 경쇄 가변 부위 서열에서 구조 부위의 아미노산 변형도 상기 정해진 것과 같이 구성될 수 있다.

[0106] 또한 본 발명은 서열 번호: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 및 55로 구성된 군, 보다 바람직하게는 서열 번호: 37, 43 및 47로 구성된 군으로부터, 보다 더 바람직하게는 서열 번호: 37 및 47로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.

- [0107] 또한 본 발명은 서열 번호: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 및 63로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위로 구성된 군으로부터, 보다 바람직하게는 서열 번호: 25, 59 및 60로 구성된, 보다 더 바람직하게는 서열 번호: 59 및 60로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 어떤 실시예에서, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 및 55로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 및 63으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위로 구성된다.
- [0108] 어떤 실시예에서, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 37, 43 및 47로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 25, 59 및 60으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위로 구성된다. 보다 바람직한 실시예에서, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 37 및 47로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 59 및 60으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위로 구성된다. 가장 바람직한 것은 서열 번호: 37의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 60의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 37의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 37의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위 및 서열 번호: 49의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 49의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 43의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편이고, 특히 서열 번호: 37의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 60의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 서열 번호: 47의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 부위, 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 부위로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편이다.
- [0109] 상기 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열 각각이 인간 CD19에 결합할 수 있다는 것으로 보아, 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열은 본 발명의 항-CD19에 결합하는 분자를 만들기 위해 "혼합 및 매치(mixed and matched)"될 수 있다. CD19에 결합하는 상기 "혼합 및 매치"된 항체는 예를 들면 실시예에서 기술된 결합 검사법(binding assay)에 의해 검사 될 수 있다.
- [0110] 어떤 실시예에서는, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 64의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄로 구성된다.
- [0111] 어떤 실시예에서는, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 67의 아미노산 서열로 구성된 경쇄로 구성된다.
- [0112] 어떤 실시예에서는, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄로 구성된다.
- [0113] 또한, 본 발명은 인간 중쇄 및/또는 경쇄 불변 도메인으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 인간 중쇄 불변 부위는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, 및 IgE로 구성된 인간 면역 글로불린(immunoglobulin)의 군으로부터 선택될 수 있는 반면, 인간 중쇄 불변 부위 IgG, 특히 IgG1이 바람직하다. 인간 경쇄 불변 부위는 카파(kappa) 또는 람다(lamda) 불변 부위로 구성된 인간 면역 글로불린의 군으로부터 선택될 수 있는 반면, 인간 카파 불변부위가 선호된다. 어떤 바람직한 실시예에서는, 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 및 인간 경쇄 카파 불변 도메인으로 구성된다. 또한 본 발명은, 중쇄 및/또는 경쇄 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편

을 제공하는데, 여기서 인간 중쇄 불변 부위는 인간 IgG1으로부터의 CH1, 인간 IgG1으로부터의 연결부위(hinge) 및 인간 IgG3으로부터의 Fc로 구성된 아형 변이(isotypic variant)로 구성된다. 바람직하게는, 아형 변이로 구성된 인간화된 항체는 전장(full-length)의 항체이다. 보다 바람직하게는, 인간 IgG1으로부터의 CH1, 인간 IgG1으로부터의 연결부위(hinge) 및 인간 IgG3으로부터의 Fc로 구성된 아형 변이(isotypic variant)로 구성된 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 124의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열로 구성된다. 인간 IgG1[종종 네이티브 인간(native human) IgG1]으로부터의 인간 중쇄 불변 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편과 비교했을 때, 즉 변형된 중쇄 불변 부위에 관하여 아형 변이와 상이한 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편과 비교했을 때, 아형 변이는 개선된 보체 의존 세포 독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)

[0114]

[0115]

또한 본 발명은 유전적으로 동일한 또는 상이한 항체와 결합한 Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, 이중특이적 단쇄(bispecific single chain) Fv 이량체(dimers), 이중항체(diabodies), 삼중항체(triabodies) 및 scFv로 구성된 군으로부터 선택된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체의 단편을 제공한다. 바람직한 단편은 scFv, 이중특이적 단쇄(bispecific single chain) Fv 이량체(dimers) 및 이중항체이다. 또한 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 전장의 인간화된 항체를 제공한다.

[0116]

CDR 부위 또는 구조 부위 안에서 만들어진 변형 이외에 또는 상기 변형의 대안으로서, 본 발명의 항체는 일반적으로 항체의 하나 또는 그 이상의 기능적 특성, 예를 들면 혈청 반감기(serum half-life), 보체 고정(complement fixation), Fc 수용체 결합(receptor binding), 및/또는 항원-의존적 세포내 세포독성(antigen-dependent cellular cytotoxicity)와 같은 특성을 변화시키는 Fc 부위 안에서의 변형을 위해 포함하기 위해 변형될 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체는 화학적으로 변형될 수 있거나(예를 들면, 하나 또는 그 이상의 화학적 모이어티(chemical moiety)는 항체에 결합할 수 있다) 또는 그것의 당화(glycosylation)를 변화시키기 위해 변형될 수 있다. 하기에 서술된 것과 같은 Fc 부위 안에 있는 변형은 카바트의 EU 인덱스(index)의 Fc 부위내의 잔기 넘버링(numbering)을 따른다. 어떤 실시예에서, CH1의 연결 부위(hinge region)는 그 연결부위에서 시스테인 잔기의 수가 변하는 것, 예를 들면 증가하거나 감소하는 것과 같이 변형된다. 이러한 접근은 Bodmer et al.에 의해 미국 특허(U.S. Patent) No. 5,677,425에서 기술되었다. CH1의 연결 부위에서 시스테인 잔기 수는 예를 들면 경쇄 및 중쇄의 조립(assembly)을 촉진시키기 위해 또는 항체의 안정성을 증가 또는 감소시키기 위해 변화된다. 다른 실시예에서는, 항체의 Fc 연결 부위는 항체의 생물학적 반감기를 감소시키기 위해 돌연변이화된다. 보다 구체적으로, 하나 또는 그 이상의 돌연변이는 Fc-연결부위 단편의 CH2-CH3 도메인 접점 부위(interface region)에서 일어나는데, 예를 들면 항체는 원래의 Fc(native Fc)-연결 도메인(hinge domain) 스태필로코킬 단백질 A(*Staphylococcal protein A*; SpA) 결합과 비교하여 SpA 결합을 손상시킨다. 이러한 접근은 Ward et al.에 의해 미국 특허(U.S. Patent) No. 6,165,745에 기술되었다. 또 다른 실시예에서, 항체의 생물학적 반감기를 증가시키기 위해 항체는 변형된다. 다양한 접근이 가능하다. 예를 들면 Ward의 미국 특허 No. 6,277,375에 기재된 것과 같이 하나 또는 그 이상의 하기 돌연변이가 도입될 수 있다: T252L, T254S, T256F. 그렇지 않으면, Presta et al.에 의해 미국 특허 Nos. 5,869,046 및 6,121,022에 기술된 것과 같이, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해, 항체는 IgG의 Fc 부위에서 CH2 도메인의 두 개의 루프(loop)로부터 선택된 구체 수용체 결합 에피토프(salvage receptor binding epitope)를 포함하도록 CH1 또는 CL 부위 안에서 변형될 수 있다. 어떤 실시예에서는, 항체의 작용기 기능(effector function)을 변화시키기 위해, Fc 부위가 최소한 한 개의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 대체되면서 변형될 수 있다. 예를 들면, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산은 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있는데, 즉 상기 항체는 작용기 리간드(effector ligand)에 대해 바뀐 친화력(affinity)을 갖지만 모 항체의 항체-결합 능력은 보유하고 있다. 그 친화력이 변하는 작용기 리간드는, 예를 들면 Fc 수용체 또는 보체의 C1 구성요소가 될 수 있다. 이러한 접근은 Winter et al.에 의해 미국 특허 Nos. 5,624,821 및 5,648,260에 자세하게 기술되었다. 또 다른 예에서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산은 상이한 아미노산 서열로 대체될 수 있는데, 즉 상기 항체는 변형된 C1q 결합 및/또는 감소된 또는 폐지된 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)을 갖는다. 이러한 접근은 Idusogie et al.에 의해 미국 특허 Nos. 6,194,551에 자세하게 기술되었다. 또 다른 예에서는, CH2 도메인에서 N-말단 부위의 아미노산 위치 231 내지 238 내에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기는 변형되어 항체의보체를 고정시키는 능력을 변화시킨다. 이러한 접근은 Bodmer et al.에 의해 PCT 공보(PCT Publication) WO 94/29351에서 기술되었

다. 다른 예에서는, Fc 부위는 항체 의존적 세포내 세포독성(antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC)를 매개하는 항체의 능력을 증가시키기 위해 및/또는 Fc[감마] 수용체에 대한 항체의 친화력을 증기시키기 위해 하기의 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 변형된다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이 접근은 프레스타(Presta)에 의해 PCT 공보(PCT Publication) WO 00/42072에서 기술되었다.

[0117] 따라서, 바람직한 실시예에서 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하는데, 이것은 모항체의 인간 IgG Fc 부위에 대해 최소한 하나의 아미노산 변형으로 구성된 인간 IgG Fc 부위 변이로 구성되는 반면, 인간 IgG Fc 부위 변이로 구성된 항체는 모항체와 비교하였을 때 변형된 작용기 기능(effector function)을 나타낸다. 바람직하게, 항체는 인간 IgG1 Fc 부위 변이로 구성된다. 더 바람직하게는 인간 IgG1 Fc 부위 변이로 구성된 전장(full-length)의 항체이다. 모항체는 인간 CD19에 결합하고 인간 IgG Fc 부위의 아미노산 변형을 제외한 인간 IgG Fc 부위 변이로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체와 동일한 인간화된 항체 또는 그것의 단편이고 대개 원래의(native) 인간 IgG Fc 부위를 갖는 항체이다. 바람직하게는 아미노산 변형은 동위원소를 사용하는 것이 아니다.

[0118] 변형된 작용기 기능은 대개 CDC 및/또는 C1q 결합 및/또는 ADCC 및/또는 Fc[감마] 수용체에 대한 항체의 결합 친화력, 바람직하게는 CDC 및/또는 ADCC이다. CDC, C1q 결합, ADCC 및 Fc[감마] 수용체에 대한 항체의 결합 친화력은 당업계에서 잘 알려지고 상업적으로 사용 가능한 표준 시험관내 검사법(in vitro assay)에 의해 측정되었다. 대개 ADCC는 예를 들어 본 발명의 실시예 4에 기술된 락테이트 탈수소화효소(lactate dehydrogenase; LDH)-분비(release) 검사법에 의해 측정되고, CDC는 예를 들어 본 발명의 실시예 10에 기술된 세포-기초한 검사법(cell-based assay)에 의해 측정되었다.

[0119] 어떤 실시예에서, 모항체에 비해 작용기 기능을 바꾸는 아미노산 변형은 269, 274, 276, 298, 324 및 334로 구성된 군으로부터 선택된, 바람직하게는 269, 298 및 324로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 더 바람직하게는 298 및/또는 324의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환으로 구성되어 있고, 여기에서 각각의 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0120] 어떤 실시예에서, 모항체와 비교하였을 때 작용기 기능을 바꾸는 아미노산 변형은 E269D, K274Q, N276K, S298A, S324N, 및 K334R의 군으로부터 선택된, 보다 바람직하게는 E269D, S298A 및 S324N의 군으로부터 선택된, 보다 더 바람직하게는 S298A 및/또는 S324N의 아미노산 치환으로 구성되어 있고, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0121] 다른 실시예에서 모항체와 비교하여 작용기 기능을 변화시키는 아미노산 변형은 269/274, 269/276, 269/298, 269/324, 269/334, 274/276, 274/298, 274/324, 274/334, 276/298, 276/324, 276/334, 298/324, 298/334, 324/334, 269/274/276, 269/274/298, 269/274/324, 269/274/334, 269/276/298, 269/276/324, 269/276/334, 269/298/324, 269/298/334, 274/276/298, 274/276/324, 274/276/334, 274/298/324, 274/298/334, 276/298/324, 및 276/298/334로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 바람직하게는 274/276, 269/298, 298/324, 274/276/334, 및 269/298/324로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 더 바람직하게는 298/324 및 269/298/324로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서의 아미노산 치환의 조합으로 구성되고, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0122] 다른 실시예에서 모항체에 비해 작용기 기능을 변형시키는 아미노산 변형은 E269D/K274Q, E269D/N276K, E269D/S298A, E269D/S324N, E269D/K334R, K274Q/N276K, K274Q/S298A, K274Q/S324N, K274Q/K334R, N276K/S298A, N276K/S324N, N276K/K334R, S298A/S324N, S298A/K334R, S324N/K334R, E269D/K274Q/N276K, E269D/K274Q/S298A, E269D/K274Q/S324N, E269D/K274Q/K334R, E269D/N276K/S298A, E269D/N276K/S324N, E269D/N276K/K334R, E269D/S298A/S324N, E269D/S298A/K334R, K274Q/N276K/S298A, K274Q/N276K/S324N, K274Q/N276K/K334R, K274Q/S298A/S324N, K274Q/S298A/K334R, N276K/S298A/S324N, 및 N276K/S298A/K334R로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 바람직하게는 K274Q/N276K, E269D/S298A, S298A/S324N, K274Q/N276K/K334R, 및 E269D/S298A/S324N로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 더 바람직하게는 S298A/S324N 및 E269D/S298A/S324N로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환의 조합으로 구성되고, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0123] 바람직하게는, 인간 IgG Fc 부위 변이로 구성된 본 발명의 인간화된 항-CD19 항체는 모항체와 비교하였을 때 상

기 기술된 시험관 내 검사법(in vitro assay)에서 개선된 CDC를 나타내었다. 여기서 사용되는 개선된 CDC의 나타남(exhibition)은 하기를 포함한다: a) 모항체와 비교하였을 때 증진된 CDC가 나타남, 즉 모항체는 이미 인간 IgG Fc 부위에서의 아미노산 변형에 의해 증진된 CDC를 나타낸다; 및 b) 모항체와 비교하였을 때 드노보(de novo)에서 CDC가 나타남, 즉 모항체는 CDC를 나타내지 않으므로, 따라서 CDC는 인간 IgG Fc 부위의 아미노산 변형에 의해 드노보에서 도입된 것이다.

[0124] 어떤 실시예에서, 시험관 내 검사법(in vitro assay)에서 모항체와 비교하였을 때 개선된 CDC를 나타내는 본 발명의 인간화된 항-CD19 항체에서 인간 IgG Fc 부위의 변이는 324, 334, 274/276, 298/324, 274/276/334, 및 269/298/324로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 바람직하게는 324, 334, 298/324, 274/276/334, 및 269/298/324로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 더 바람직하게 324, 298/324, 및 269/298/324로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 아미노산의 치환 또는 아미노산 치환의 조합으로 구성되고, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0125] 어떤 실시예에서, 시험관 내 검사법(in vitro assay)에서 모항체와 비교하였을 때 개선된 CDC를 나타내는 본 발명의 인간화된 항-CD19 항체의 인간 IgG Fc 부위의 변이는 S324N, K334R, K274Q/N276K, S298A/S324N, K274Q/N276K/K334R, 및 E269D/S298A/S324N로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 바람직하게는 S324N, K334R, S298A/S324N, K274Q/N276K/K334R, 및 E269D/S298A/S324N로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 더 바람직하게는 S324N, S298A/S324N, 및 E269D/S298A/S324N로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 아미노산 치환 또는 아미노산 치환의 조합으로 구성되며, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0126] 어떤 실시예에서, 시험관 내 검사법(in vitro assay)에서 모항체와 비교하였을 때 개선된 ADCC를 나타내는 본 발명의 인간화된 항-CD19 항체의 인간 IgG Fc 부위의 변이는 269, 298, 269/298, 269/324, 298/324, 및 269/298/324로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 바람직하게는 298, 269/298, 269/298/324로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 아미노산 치환 또는 아미노산 치환의 조합으로 구성되고, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0127] 어떤 실시예에서, 시험관 내 검사법(in vitro assay)에서 모항체와 비교하였을 때 개선된 ADCC를 나타내는 본 발명의 인간화된 항-CD19 항체의 인간 IgG Fc 부위의 변이는 E269D, S298A, E269D/S298A, E269D/S324N, S298A/S324N, 및 E269D/S298A/S324N로 구성된 군으로부터 선택된, 보다 바람직하게는 S298A, E269D/S298A, 및 E269D/S298A/S324N로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서의 아미노산 치환 또는 아미노산 치환의 조합으로 구성되고, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 명시된다.

[0128] 따라서, 본 발명에 의해 제공되는 모 인간화된 항체에 비해 변화된 작용기 기능을 나타내고 인간 CD19에 결합하는 특별히 바람직한 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 서열 번호: 114(VH16 R94K/S298A)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 115(VH16 R94K/E269D/S298A)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 116(VH16 R94K/ S298A/S324N)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 117(VH16 R94K/E269D/S298A/S324N)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 118(VH16 R94K/S324N)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 119(VH16 R94K/K274Q)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 120(VH16 R94K/N276K)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 121(VH16 R94K/K334R)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 122(VH16 R94K/K274Q/N276K)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 123(VH16 R94K/K274Q/N276K/K334R)의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 65(VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A)의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열로 구성된 인간화된 항체 또는 그것의 단편이다.

[0129] 또한 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기서 상기 항체는 모항체의 아미노산 서열 324의 세린(serine)이아스파라긴(asparagine)으로 치환된 아미노산 치환 S324N으로 구성된 인간 IgG Fc 부위 변이로 구성되고, 반면에 상기 인간 IgG Fc 부위 변이로 구성된 항체는 모항체와 비교했을 때 개선된 CDC(complement dependent cytotoxicity)를 나타낸다. 바람직하게 상기 항체는 인간 IgG1 Fc 부위 변이로 구성된다. 보다 더 바람직하게는 인간 IgG1 Fc 부위 변이로 구성된 전장의 항체이다. 놀랍게도, 실시예 10에서 기술되듯이 16개의 다른 아미노산 치환 중에서 아미노산 위치 324의 치환 S324N은 모항체와 비교하였을 때 유의적으로 CDC를 개선시킨 반면 다른 치환은 모항체와 비교하였을 때 CDC를 개선시키지 않았다. 이론에 의해 연결되는 것 없이, 이러한 예상치 못한 CDC에 대한 S324N 치환의 선택적인 결과는 인간 보체 구성요소인 C1q에 대한 증진된 결합 때문인 것으로 보인다.

[0130] 또한 본 발명은 인간 IgG Fc 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하는데, 여기에서 인간 IgG Fc 부위에 결합한 성숙한 중심(mature core) 탄수화물(carbohydrate) 구조는 푸코오즈(fucose)가 결합되어 있다. 바람직하게 상기 항체는 인간 IgG1 Fc 부위로 구성되어 있고, 여기에서 인간 IgG1 Fc 부위에 결합한 성숙한 중심 탄수화물 구조는 푸코오즈(fucose)가 결합되어 있다. 보다 더 바람직한 것은 인간 IgG1 Fc 부위로 구성된 전장(full-length)의 항체이고, 여기에서 인간 IgG1 Fc 부위에 결합한 성숙한 중심 탄수화물 구조는 푸코오즈(fucose)가 결합되어 있다. WO 2003/035835로부터 인간 IgG Fc 부위에 결합된 성숙한 중심 탄수화물 구조에서 푸코오즈의 결합은 ADCC를 증진시킬 수 있다. 따라서, 어떤 실시예에서, 본 발명의 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 인간 IgG Fc 부위로 구성되어 있고, 여기에서 인간 IgG Fc 부위에 결합된 성숙한 중심 탄수화물 구조는 푸코오즈가 결합되어 있는 반면, 푸코오즈가 결합된 항체는 푸코오즈가 결합되지 않은 모 인간화된 항체 또는 그것의 단편에 비해 증진된 ADCC를 나타낸다. 인간 IgG Fc 부위로 구성된 인간 CD19에 결합하는 바람직한 항체 또는 그것의 단편, 여기에서 인간 IgG Fc 부위에 결합된 성숙한 중심 탄수화물 구조는 푸코오즈가 결합된 반면, 푸코오즈가 결합되지 않은 모 인간화된 항체 또는 그것의 단편과 비교할 때 증진된 ADCC를 나타내는 푸코오즈가 결합된 항체는 서열 번호: 64의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열로 구성된 항체이다. 푸코오즈가 결합된 항체를 생산하는 방법은, 예를 들면, (a) 푸코오즈 대사(metabolism)이 결합된 유전적으로 조작된 또는 돌연변이 숙주 세포의 사용, 즉 상기의 세포는 그 안에서 발현된 단백질을 푸코실화(fucosylate)하는 능력이 감소(또는 할 수 없음); (b) 푸코실화(fucosylation)를 예방하거나 또는 감소시키는 조건하에서 세포를 배양; (c) 푸코오즈의 번역후(post-translational) 제거(예를 들면, 푸코시데이즈 효소(fucosidase enzyme); (d) 번역후 원하는 탄수화물(carbohydrate)의 첨가, 예를 들면 비당화 당단백질(non-glycosylated glycoprotein)의 재조합 발현 후; 또는 (e) 푸코실화 되지 않은 생산물을 선택하기 위한 당단백질의 정제. 예를 들면 Longmore et al. (1982), Carbohydr. Res. 365-92, 또는 Imai-Nishiya et al. (2007), BMC Biotechnol. 7, 84에 기술된 방법과 같은 실시예 14에 기술된 방법이 바람직하게 사용된다.

[0131] **항 CD-19 항체(Anti-CD19 antibodies)의 특성**

[0132] 예를 들면 인간 CD19에 대한 항체의 결합 친화력을 평가하기 위한 표준 검사법은 예를 들면 ELISAs, 웨스턴 블랏(Western blots), RIAs, 및 세포 유동 분석(flow cytometry analysis; Facs)을 포함하여 당업계에 알려져 있다. 적당한 검사법은 실시예에 자세하게 기술되어 있다. 항체의 결합 반응속도론(kinetics) (예를 들면, K_d 와 같은 결합 친화력)도 스캐차드(Scatchard) 또는 비아코어 시스템 분석(Biacore<(R)> system analysis)과 같은 당업계에 알려진 표준 검사법에 의해 검사될 수 있고 실시예 3에 기술된 것과 같은 방법으로 수행되고 계산될 수 있다. 상대 결합 친화력 K_i 는 당업계에 알려진 표준 경쟁 검사법(standard competition assay)에 의해 검사될 수 있고 실시예 3에 기술된 것과 같이 수행되고 계산될 수 있다. 결합을 검사하기 위해서, 라지 종양 세포(Raji tumor cell) (human Burkitt lymphoma, DSMZ ACC319), NALM-6 (human B cell precursor leukemia, DSMZ AC128) 또는 SU-DHL-6 (human B cell lymphoma, DSMZ ACC572)이 사용될 수 있고, 바람직하게는 인간 버킷 림프종(human Burkitt lymphoma) DSMZ ACC319와 같은 라지 종양 세포 또는 SU-DHL-6 (human B cell lymphoma, DSMZ ACC572), 더욱 바람직하게는 인간 버킷 림프종 DSMZ ACC319와 같은 라지 종양 세포가 사용된다. 상기 세포들은 독일생물자원은행(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany)과 같이 공개적으로 이용 가능한 곳으로부터 취득될 수 있고, 세포 유동 분석과 같은 표준 검사법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 검사에서 사용되는 상응하는 키메라 항체(chimeric antibody)는 대개 인간 IgG1 중쇄 불변 도

메인과 결합된 FMC63 쥐 중쇄 가변 도메인 및 카파 불변 도메인(kappa constant domain)과 결합된 쥐 경쇄 가변 도메인으로 구성된 쥐 항체 FMC63의 키메라 형태이다. 본 발명의 검사에서 바람직하게 사용되는 반응하는 키메라 항체는 서열 번호: 68의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열로 구성된 항체 FMC63의 키메라 형태이다. 본 발명의 검사에서 사용되는 모의 비인간화된 항체(parental non-humanized antibody) 또는 반응하는 모의 비인간화된 항체는 대개 쥐 항체, 특히 쥐 항체 FMC63이다.

[0133] 본 발명은 그 반응하는 키메라 항체의 결합과 비교하여 라지 종양 세포에 최소 10%의 중간-부분 형광(Mid-Point Fluorescence; MPF)로 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 라지 종양 세포는 그 표면에 인간화된 항체 또는 그것의 단편이 결합할 수 있는 CD19를 발현하지 않는다. MPF의 값은 세포 유동 분석을 사용하여 염색한 세포의 평균 형광 강도(Mean Fluorescent Intensity; MFI) 대(versus) 항체 농도의 측정으로부터 얻어질 수 있다. 바람직하게 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 그 반응하는 키메라 항체의 결합과 비교하여, 최소 30%, 더 바람직하게는 최소 50%, 가장 바람직하게는 최소 70%, 구체적으로 최소 80%, 더 구체적으로 최소 90%, 가장 구체적으로는 최소 95%의 MPF로 라지 종양 세포에 결합한다. 상기 기술된 라지 종양 세포는 CD19에 결합하는 것을 검사하기 위해 사용될 수 있다.

[0134] 본 발명은 50nM 또는 그 이하의, 구체적으로 40nM 또는 그 이하, 더 구체적으로 30nM 또는 그 이하, 그보다 더 구체적으로는 20nM 또는 그 이하, 가장 구체적으로는 15nM 또는 그 이하의 친화력(K_d)으로 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 상기에 기술된 라지 종양 세포는 인간 CD19와 결합을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0135] 본 발명은 그 반응하는 키메라 항체의 CD19 결합 친화력(K_d)의 최소 20%를 보유하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 상기 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 그 반응하는 키메라 항체의 CD19 결합 친화력(K_d)의 바람직하게 최소 40%, 더 바람직하게 최소 60%, 가장 바람직하게 최소 80%, 구체적으로 최소 90%, 보다 구체적으로 최소 95%의 CD19 결합 친화력을 보유한다. 상기 기재된 라지 종양 세포 또는 SU-DHL-6 세포는 인간 CD19와 결합을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0136]

[0137] 또한, 본 발명은 인간 CD19에 결합하고 50nM 또는 그 이하, 바람직하게는 20nM 또는 그 이하, 보다 바람직하게는 10nM 또는 그 이하, 가장 바람직하게는 5nM 또는 그 이하, 구체적으로 4nM 또는 그 이하, 보다 구체적으로는 3nM 또는 그 이하, 가장 구체적으로는 1.5nM 내지 약 5.0nM(예를 들면, 1.9; 1.6 또는 2.9 내지 약 2.6 또는 4.9nM)의 친화력(K_i)으로 라지 종양 세포에 결합하기 위해 경쟁하는 인간화된 항체 또는 단편을 제공한다. 결합 경쟁(binding competition)은 대개 그 반응하는 키메라 항체에 대해 측정되는 반면, 상기에 기술된 라지 종양 세포는 K_i 를 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0138] 본 발명은 인간 CD19에 결합하고 라지 종양 세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 라지 종양 세포에서 세포자멸사의 유도는 아넥신-V(annexin-V) 및 프로피듐 아이오딘(propidium iodine; PI) 염색을 통해 측정될 수 있다(Vermes et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184: 39-51). 그 키메라 항체는 세포자멸사를 유도하지 않는다는 사실의 관점에서, 세포자멸사의 유도는 본 발명의 인간화된 항체에 의해 나타나는 매우 놀라운 특성이다. 상기 기술된 라지 종양 세포는 세포자멸사를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 따라서 본 발명은 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공하고, 여기서 세포자멸사는 라지 종양 세포의 최소 10%, 바람직하게는 최소 15%, 보다 바람직하게는 최소 20%, 가장 바람직하게는 최소 25%에서 유도된다.

[0139] 본 발명은 인간 CD19에 결합하고 라지 종양 세포에서 ADCC 활성을 유도하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을

제공한다. 상기 기술된 라지 종양 세포와 같이 표적 세포의 특이적 용해(lysis)와 관련된 ADCC는 젯상 탈수소 화효소(lactate dehydrogenase; LDH) 분비 검사(CytoTox 96 Non radioactive assay, Promega, Madison, USA) 법과 같은 것을 사용하여 측정될 수 있다. 놀랍게도 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 그 상응하는 키메라 항체의 ADCC 활성 유도와 동일하거나 또는 그보다 더 높게 라지 종양 세포에서 ADCC 활성을 유도한다. CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 결합하는 단편은 그의 상응하는 키메라 항체의 ADCC 활성의 바람직하게는 최소 80%, 보다 바람직하게는 최소 100%, 가장 바람직하게는 최소 120%를 갖는다.

[0140] 또한, 본 발명은 인간 CD19에 결합하고 악성(malignant) B 세포의 증식을 억제하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 그 상응하는 키메라 항체의 바람직하게는 최소 60%, 보다 바람직하게는 최소 80%, 가장 바람직하게는 최소 90%, 보다 구체적으로는 최소 95%, 보다 구체적으로는 100%의 악성 B세포의 증식을 억제한다. 항체에 의해 세포 증식의 억제를 측정하기 위하여, 상기 기술된 라지 종양 세포 또는 SU-DHL-6 세포는 악성 B 세포의 증식을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0141] 또한, 본 발명은 인간 CD19에 결합하고 라지 세포의 클론 형성능력(clonogenicity)을 억제하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 클론 형성능력의 억제는 항체를 처리한 후 클론(clone)의 수를 세어 측정하고 예를 들면 "Nahimana et al., 2009, Blood. 0: blood-2008-08-173369v1 (Blood, 2009, Vol. 113, No. 14, pp. 3276-3286)"에 따라서 수행될 수 있다. 상기 기술된 라지 종양 세포는 클론 형성능력을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 인간화된 항체 처리 후 세어진 클론의 수는 그 상응하는 키메라 항체 처리 후 세어진 클론의 수보다 최소 30%, 바람직하게는 최소 30%, 바람직하게는 최소 40%, 보다 바람직하게는 최소 50%, 가장 바람직하게는 최소 60% 이하이다. 라지 종양 세포의 클론 형성능력의 억제는 본 발명의 인간화된 항체의 강력한 B 세포 증식 억제 기능을 확인시켜준다.

[0142] 또한 본 발명은 인간 CD19에 결합하고 혈액에서 B 세포의 고갈(depletion)을 야기한다. 바람직하게 유도되는 B 세포의 고갈은 그 상응하는 키메라 항체에 의해 유도되는 B 세포의 고갈과 최소한 동일하고, 바람직하게는 그의 최소 1.5배, 보다 바람직하게는 최소 2배 이상이다. B 세포 고갈은 실시예에 기술된 것과 같이 항체와 배양한 후 전체 혈액에서 양성 B 세포(positive B cell)의 %를 결정함으로써 측정될 수 있다.

[0143] 또한, 본 발명은 인간 CD19에 결합하고 라지 종양 세포에 내재화(internalization)되는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 본 발명의 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 그 상응하는 키메라 항체의 내재화와 유사한 정도로 내재화된다. 바람직하게, 0.001 µg/ml에서 사용될 때 본 발명의 인간화된 항체의 내재화 정도는 그 상응하는 키메라 항체의 내재화 정도의 50% 및 150% 사이이고, 보다 바람직하게는 60% 및 140% 사이이고, 가장 바람직하게는 70% 및 130% 사이이다. 항체 내재화는 예를 들면 독소 사포린(saporin)이 결합된 2차 항-인간 항체를 이용하여 상기 기술된 것과 같이 라지 세포에서 측정될 수 있다(Hum-Zap, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA).

[0144] 본 발명의 FAB 단편 내열성(FAB fragment thermostability) 온도가 65℃ 이상, 바람직하게는 70℃ 이상, 보다 바람직하게는 75℃ 이상, 가장 바람직하게는 80℃을 갖는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. FAB 단편 내열성을 분석하기 위해, 시차 주사 열량 측정법(differential scanning calorimetry measurements)이 사용된 반면, 전장(full-length)의 IgG에서 FAB 단편의 중간 녹는점(mid-point melting temperature)을 측정하였다. 이러한 종류의 열량 측정법은 당업자에게 알려져 있고, 예를 들면 Garber and Demarest (2007), BBRC 355:751-7에 따라 수행될 수 있다.

[0145] 놀랍게도, 본 발명의 인간화된 항체는 FAB 내열성 온도가 그 상응하는 키메라 항체와 동일하다는 것이 밝혀졌다. 따라서 본 발명은 그것의 키메라 항체의 FAB 내열성 온도와 동일한 FAB 단편 내열성 온도를 갖고 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.

[0146] **핵산, 벡터 및 숙주 세포**

[0147] 본 발명은 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 암호화하는 분리된 핵산, 벡터 및 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 핵산은 전체 세포, 세포 용리액(cell lysate), 또는 부분적으로 정제되거나 또는 상당히 순수한 형체에 있을 수 있다. 다른 세포 구성요소 또는 다른 물질(contaminants), 예를 들면 다른 세포 핵산 또는 단백질과 같은 것으로부터 알칼라인/SDS 처리(alkaline/SDS), CsCl 밴딩(banding), 컬럼 크로마토그래피(column chromatography), 아가로오스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis) 및 당업계에 잘 알려진 다른 것들을 포함하는 일반 기술(standard techniques)에 의해(참조 F. Ausubel, et al, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.) 분리되었을 때, 핵산은 "분리되거나(isolated)" 또는 "상당히 순수(rendered substantially pure)" 하다. 본 발명의 핵산은, 예를 들면 DNA 또는 RNA 일 수 있고 인트론 서열(intronic sequence)을 포함할 수도 또는 하지 않을 수도 있다. 바람직한 실시예에서, 핵산은 cDNA 분자이다.

[0148] 본 발명의 핵산은 일반 분자 생물학 기술(standard molecular biology techniques)을 사용하여 수득될 수 있다. 예를 들면, 항체의 중쇄 또는 경쇄 암호화하는 또는 VH 및 VL 부분(segment)를 암호화하는 cDNA는 일반 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 면역 글로불린 유전자 라이브러리(immunoglobulin gene library)으로부터 수득된[예를 들면, 페이지 표현 기술(phage display techniques)을 사용하여] 항체를 위해, 항체를 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산을 라이브러리로부터 회복시킬 수 있다. 숙주 세포로 외부 핵산 도입(introducing exogenous nucleic acid)의 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 사용되는 숙주 세포에 따라 다양하다. 기술은 텍스트란-매개 형질도입(dextran-mediated transfection), 칼슘 포스페이트 침전(calcium phosphate precipitation), 칼슘 클로라이드 처리(calcium chloride treatment), 폴리브렌-매개 형질도입(polybrene mediated transfection), 프로토플라스트 융합(protoplast fusion), 전기영동(electroporation), 바이러스 또는 페이지 감염(viral or phage infection), 리포솜안의 폴리뉴클레오티드의 피막형성(encapsulation of the polynucleotide(s) in liposomes), 및 핵으로 DNA의 직접적인 미세주입(direct microinjection of the DNA into nuclei)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 포유류 세포의 경우, 형질도입(transfection)은 일시적(transient) 또는 안정적(stable)일 수 있다.

[0149] 본 발명의 바람직한 핵산 분자는 서열 번호: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 및 63로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 부위 및/또는 서열 번호: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 및 55로 구성되는 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 부위를 암호화하는 것이다. 보다 바람직하게 핵산 분자는 서열 번호: 64의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 67의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 66의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 114의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열;; 또는 서열 번호: 115의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 116의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 117의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 118의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 119의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 120의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 121의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 122의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 123의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열; 또는 서열 번호: 124의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 서열, 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 서열로 암호화된 것이다.

[0150] 또한, 본 발명은 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 어세션 No. DSM 23302를 갖는 미생물에 있는 인간 CD19와 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 중쇄를 암호화하는 핵산 서열로 구성된 분리된 핵산을 제공한다. 인간 CD19에 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 축적된 핵산 서열에 의해 암호화되는 중쇄는 서열 번호: 27의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR1, 서열 번호: 28의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR2, 및 서열 번호: 29

의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 CDR3으로 구성된다.

- [0151] 또한, 본 발명은 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 어세션 No. DSM 23303를 갖는 미생물에 있는 인간 CD19와 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 경쇄를 암호화하는 핵산 서열로 구성된 분리된 핵산을 제공한다. 인간 CD19에 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 축적된 핵산 서열에 의해 암호화되는 경쇄는 서열 번호: 30의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR1, 서열 번호: 31의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR2, 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 CDR3으로 구성된다.
- [0152] 따라서 본 발명은 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 어세션 넘버(accession No). DSM 23302를 갖는 미생물에 있는 인간 CD19와 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 중쇄를 암호화하는 핵산 서열로 구성된 분리된 핵산 및 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 어세션 넘버. DSM 23303을 갖는 미생물에 있는 인간 CD19와 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 경쇄를 암호화하는 핵산 서열로 구성된 분리된 핵산에 의해 암호화되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다.
- [0153] 어떤 실시예에서 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 어세션 No. DSM 23302를 갖는 미생물에 있는 인간 CD19와 결합하는 인간화된 FMC63 변이의 중쇄를 암호화하는 핵산 서열로 구성된 분리된 핵산에 의해 암호화되는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편은 인간 IgG Fc 부위 변이로 구성되고, 바람직하게는 269, 274, 276, 298, 324 및 334로 구성되는 군으로부터 선택되는, 보다 바람직하게는 269, 298 및 324로 구성되는 군으로부터 선택되는, 가장 바람직하게는 298 및/또는 324의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환으로 구성되는 IgG1 Fc 부위의 변이이고, 여기에서 각 군 멤버의 아미노산 위치는 카바트의 넘버링 시스템을 이용하여 나타낸다.
- [0154] 일단 VH 및 VL 부분을 암호화하는 DNA 단편이 수득되면, 상기 DNA 단편은 일반적인 재조합 DNA 기술에 의해 더 조작, 예를 들면 가변부위 유전자를 전장(full-length)의 항체 쇠(chain) 유전자로, 또는 Fab 단편과 같이 상기 기술했던 단편에 상응하는 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킬 수 있다. 이러한 조작에서, VL 또는 VH를 암호화하는 조각을 통해 DNA 단편은 항체 불변 부위 또는 유동성 있는 링커(flexible linker)와 같은 다른 단백질을 암호화하는 또 다른 DNA 단편에 연결된다. 이 내용에서 사용되는 "조작을 통한 연결(operatively linked)"이라는 용어는 두 개의 DNA 단편이 연결되는, 즉 두 개의 DNA 단편에 의해 암호화되는 아미노산 서열이 인-프레임(in-frame)에 남아있는 것을 뜻하려는 것이다. VH 부위를 암호화하는 분리된 DNA는 VH를 암호화하는 DNA를 중쇄 불변 부위(CH1, CH2 및 CH3)를 암호화하는 다른 DNA 분자에 연결시키는 조각을 통해서 전장(full-length)의 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 부위 유전자의 서열은 당업계에 알려져 있고(예를 들면 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242를 참조), 상기 부위를 포함하는 DNA 단편은 일반적인 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다. 중쇄 불변 부위는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 부위일 수 있으나, 가장 바람직하게는 IgG1 불변 부위이다. Fab 단편 중쇄 유전자에서, V[pi]를 암호화하는 DNA는 조각을 통해 오직 중쇄 CH1 불변 부위를 암호화하는 또 다른 DNA 분자와 연결될 수 있다. VL 부위를 암호화하는 분리된 DNA는 VL을 암호화하는 DNA를 경쇄 불변 부위, CL을 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 연결시키는 조각을 통해 전장(full-length)의 경쇄 유전자(Fab 경쇄 유전자 뿐만 아니라)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 유전자의 서열은 당업계에 알려져 있고(예를 들면, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242를 참조), 이러한 부위를 포함하는 DNA 단편은 일반적인 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 경쇄 불변 부위는 카파(kappa) 또는 람다(lamda) 불변 부위일 수 있고, 바람직하게는 카파 불변 부위이다. scFv 유전자를 만들기 위해, VH 및 VL을 암호화하는 DNA 단편은 유동성 있는 링커(flexible linker), 예를 들면 아미노산 서열 (GIy4 -Ser)3을 암호화하는 또 다른 단편에 조각을 통해 연결된다. 즉 VH 및 VL 서열은 유동성이 있는 링커에 의해 연결된 VL 및 VH 부위와 함께 인접한 단쇄 단백질(singel-chain protein)으로서 발현될 수 있다(예를 들면, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883; McCafferty et al, (1990) Nature 348:552-554를 참조). 다양한 기술은 인간화된 항체의 항체 단편을 만들기 위해 개발되어 왔다. 전통적으로, 이러한 단편들은 본연의 항체(intact antibody)의 단백질을 가수분해 잘림(proteolytic digestion)을 통해 유래되었다(예를 들면, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., Science, 229:81 (1985)를 참조). 하지만, 이러한 단편은 재조합 숙주 세포에 의해 현재 직접적으로 생산될 수 있다. 예를 들면, 항체 단편은 상기 논의된 항체 페리지 라이브러리(antibody phage libraries)로부터 분리될 수 있다. 그렇지 않으면, Fab'-SH 단편은 직접적으로 E.coli로부터 회복될 수 있고 F(ab')₂ 단편을 형성하기

위해 화학적으로 연결될 수 있다[Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)]. 또 다른 접근에 따르면 F(ab')₂ 단편은 직접적으로 재조합 숙주 세포 배양으로부터 분리될 수 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기술은 당업자에게 명백하다. 다른 실시예에서, 항체의 선택은 단쇄(single-chain) Fv 단편(scFv)이다(예를 들면, WO 1993/16185; 미국 특허. No. 5,571,894; 및 미국 특허. No. 5,587,458.) 상기 항체 단편은 "선형 항체(linear antibody)"일 수도 있다(예를 들면, 미국 특허 No. 5,641,870를 참조).

[0155] 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산은 그 단백질을 발현시키기 위해 발현 벡터에 통합될 수도 있다. 다양한 발현 벡터가 단백질 발현을 위해 사용될 수 있다. 발현 벡터는 자가복제 염색체 외 벡터(self-replicating extra-chromosomal vectors) 또는 숙주의 유전체(genome)로 통합되는 벡터로 구성될 수 있다. 발현 벡터는 숙주 세포의 종류와 양립할 수 있도록 제조된다. 따라서 본 발명에서 사용하는 발현 벡터는 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 효모(yeast), 및 시험관 내 시스템(in vitro system)에서 단백질을 발현시킬 수 있는 것을 포함하지만, 그에 한정되지는 않는다. 당업계에 알려져 있듯이, 다양한 발현 벡터가 상업적으로 또는 이용 가능하고, 그렇지 않으면 항체 발현을 위해 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0156] 발현 벡터는 일반적으로 조절(control) 또는 제한 서열(regulatory sequences)과 작용가능하게 연결되는 단백질, 선별 마커(selectable markers), 어떤 융합 파트너(fusion partner), 및/또는 첨가 요소(additional sequence)로 구성되어 있다. 여기서 "작용가능하게 연결(operably linked)"라는 것은 한 핵산이 다른 핵산 서열과 기능적 관계를 갖는 것이다. "제한 서열(regulatory sequence)"이란 용어는 항체 체(chain) 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 프로모터(promoter), 인핸서(enhancer) 및 다른 발현 조절 요소[예를 들면, 아데닐산 중합반응(polyadenylation) 신호]를 의미한다. 상기 제한 서열은 예를 들면, Goeddel [Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)]에 기술되었다. 일반적으로, 이러한 발현 벡터는 항체를 암호화하는 핵산에 작용가능하게 연결된 전사 및 번역 조절 핵산을 포함하고, 전형적으로 단백질을 발현시키려는 숙주 세포에 적절하다. 일반적으로, 전사 및 번역 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위(ribosomal binding site), 전사 개시(start) 및 종결(stop) 서열, 번역 개시 및 종결 서열, 및 인핸서(enhancer) 또는 활성(activator) 서열을 포함할 수 있다. 당업계에 알려져 있듯이, 발현 벡터는 일반적으로 그 발현 벡터를 포함하는 형질전환된(transformed) 숙주 세포를 선별하기 위해 선별 유전자(selection gene) 또는 마커를 포함한다. 선별 유전자는 당업계에서 잘 알려져 있고 사용되는 숙주 세포에 따라 다양하다. 예를 들면 일반적으로 선별 마커 유전자는 G418, 히그로마이신(hygromycin) 또는 메토포레사트(methotrexate)와 같은 약물에 대해 그 벡터가 도입된 숙주 세포에게 내성을 수여한다. 바람직한 선별 마커 유전자는 다이하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase; DHFR) 유전자(dhfr)이 도입된 숙주세포에서 메토포레사트와 함께 선별/증폭에 사용하기 위해 및 neo 유전자(G418 선별을 위해)를 포함한다.

[0157] 여기서 클로닝(cloning) 또는 벡터의 DNA를 발현시키기 위해 적절한 숙주 세포는 원핵 생물(prokaryote), 효모(yeast), 또는 더 고등의 진핵 세포(higher eukaryote cells)이다. 상기 목적을 위한 적절한 원형 생물은 그람-양성(gram-positive) 또는 그람-음성(gram-negative)균을 포함한 진정세균(eubacteria), 예를 들면 대장균(E.coli), 엔테로박터(Enterobacter), 클렙실라(Klebsiella), 프로테우스(proteus)와 같은 장내세균(Enterobacteriaceae), 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium)과 같은 살모넬라(Salmonella), 세라티아 마르케스칸스(Serratia marcescans)와 같은 세라티아(Serratia), 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 B. 섭틸리스(B. subtilis) 및 B. 리체니포르미스(B. licheniformis)와 같은 바실리(Bacilli), P. 에루기노사(P. aeruginosa)와 같은 수도모나스(Pseudomonas), 및 스트렙토마이시스(Streptomyces)를 포함한다. 적절한 E.coli 클로닝 숙주는 E. coli 294(ATCC 31,446), E. coli B, E. coli X1776(ATCC 31,537), 및 F. coli W3110(ATCC 27,325)를 포함한다.

[0158] 원핵생물뿐만 아니라, 사상 균류(filamentous fungi) 또는 효모(yeast)와 같은 진핵 미생물은 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미스 세레비시아(Saccharomyces cerevisiae), 또는 일반적인 베이커스 효모(baker's yeast)는 저급의 진핵 숙주 미생물(lower eukaryotic host microorganisms) 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 하지만, 다른 많은 속(genera), 종(species), 및 계(strain)는 일반적으로 이용가능하고 유용하다. 예를 들면, 시조사카로리시스 폼(Schizosaccharomyces pombe); K. 락티스[K. lactis], K. 프라길리스[K. fragilis(ATCC 12,424)], K. 불가리쿠스[K. bulgaricus(ATCC 16,045)] K. 위케라미[K. wickerhamii(ATCC 24,178)], K.

WalTh(AJCC 56,500), K. 드로속마룸[K. drosopmarum(ATCC 36,906)], K. 서모톨란스[K. thermotolerans], 또는 K. 마시아누시아로위아[K. marxianusyarrowia(EP 402226)]를 포함하는 클로이베로미시스 숙주(Kluyveromyces hosts); 피키아 파스토리스[Pichia pastoris(EP 183,070)]; 캔디다(Candida); 트리코더마 리시아[Trichoderma reesia(EP 244234)]; 누로스포라크라사(Neurospora crassa); 스바니오미시스 오시텐탈리스(Schwanniomyces occidentalis)와 같은 스바니오미시스(Schwanniomyces); 및 누로스포라(Neurospora), 페니실리움(Penicillium), 톨리포크라디움(Tolypocladium)을 포함하는 사상 균류(filamentous fungi), 또는 A. 니둘란스(A. nidulans) 또는 A. 니거(A. niger)와 같은 아스퍼길루스 숙주(Aspergillus hosts)가 있다.

[0159] 본 발명의 인간화된 항체의 발현을 위한 적절한 숙주는 다세포생물(multicellular organism)에서 유래된다. 무척추 세포(invertebrate cells)의 예는 플라릴(plaril) 및 곤충세포(insect cell)를 포함한다. 많은 바콜로바 이러스제(baculoviral strain) 및 변이 및 스포도테라 프루기퍼다[Spodoptera frugiperda (caterpillar)], 애데스 아우깃티[Aedes augypti (mosquito)], 애데스 알보픽투스[Aedes albopictus (mosquito)], 드로소필라 멜라노게스터[Drosophila melanogaster (fruitfly)], 및 봄빅스 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터 상응하는 허용되는 곤충 숙주 세포가 밝혀졌다. 예를 들면, 오토그라파 캘리포니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이(variant) 및 봄빅스 모리(Bombyx mori) NPV의 Bm-5 계와 같은 다양한 바이러스제(viral strain)가 형질도입(transfection)을 위해 공개적으로 이용가능하고, 특히 스포도테라 프루기퍼다 세포(Spodoptera frugiperda cells)의 형질도입을 위해, 상기 바이러스를 사용할 수 있다. 목화(cotton), 옥수수(corn), 감자(potato), 대두(soybean), 피튜니아(petunia), 토마토(tomato), 및 담배(tobacco)의 식물 세포 배양(plant cell culture)가 숙주로서 사용될 수 있다.

[0160] 본 발명의 재조합 항체를 발현시키기 위한 숙주 세포는 바람직하게, 예를 들면 R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol 159:601-621에 기술된 것과 같이 DHFR 선별 마커와 함께 사용되는, Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4220에 기술된(dhfr<-> CHO cells 포함) 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary; CHO) 세포, NSO 골수종(myeloma) 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함하는 포유류 숙주 세포이다. 구체적으로, NSO 골수종 세포와 함께 사용하기 위해, 또 다른 바람직한 발현 시스템은 WO 87/04462(Wilson), WO 89/01036(Bebbington) 및 EP 338841(Bebbington)에 공개된 GS 유전자 발현 시스템이다. 재조합 항체 유전자가 포유류 숙주 세포로 도입되었을 때, 숙주 세포에서 항체가 발현되기 위한 또는, 보다 바람직하게 숙주 세포가 자라고 있는 배지(culture medium)로 상기 항체가 분비되기 위한 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 상기 항체가 생산된다. 인간 CD19에 결합하는 항체를 생산하기 위해 유용한 숙주 세포는 다양한 배지(media)에서 배양될 수 있다. 햄스 F10(Ham's F10) (Sigma), 미니멈 에센셜 배지(Minimal Essential Medium; MEM) (Sigma), RPMI-1640(Sigma 또는 Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 및 돌베코스 모디파이드 이글스 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM), (Sigma)와 같은 상업적으로 이용 가능한 배지가 숙주 세포를 배양하는데 적절하다. 항체는 일반적인 단백질 정량 방법(standard protein purification methods)을 사용하여 배지로부터 되찾을 수 있다.

[0161] 발현되는 단백질의 표적(targeting), 정제, 스크리닝(screening), 배치(display), 및 그와 같은 것을 가능하게 하기 위해서 항체는 작용가능하게 융합 파트너(fusion partner)와 연결될 수 있다. 융합 파트너(fusion partner)는 링커 서열(linker sequence)을 통해서 항체 서열과 연결될 수 있다. 링커 서열은 일반적으로 적은 아미노산으로 구성되어 있고, 비록 더 긴 링커가 사용될 수 있지만, 전형적으로 10개 이하이다. 전형적으로 링커 서열은 분해(degradation)에 대해 내성이 있고 유연하도록 선택된다. 당업자에 의해 이해될 수 있듯이, 다양한 서열의 어떤 것이 링커로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 일반적인 링커 서열은 아미노산 서열 GGGGS로 구성되어 있다. 융합 파트너는 원하는 세포내 위치 또는 세포외 배지(extracellular media)로 항체 및 어떤 연관된 융합 파트너를 지향하게 하는 표적(targeting) 또는 신호(signal) 서열일 수 있다. 당업계에서 알려져 있듯이, 특정 신호 서열(signaling sequence)은 단백질을 성장 배지(growth media), 또는 세포의 내막 및 외막 사이에 위치한 원형질 외극(periplasmic space)으로 분비되도록 표적할 수 있다. 융합 파트너는 정제 및/또는 스크리닝을 가능하게 하는 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 서열일 수 있다. 상기 융합 파트너는 폴리히스티딘 태그(polyhistidine tags; His-tags) (예를 들면 H6 및 H10 또는 고정 메탈 친화성 크로마토그래피(Immobilized Metal Affinity Chromatography; IMAC) 시스템 (예를 들면, Ni<+2> 친화성 컬럼)과 사용하기 위한 다른 태그, GST 융합(fusions), MBP 융합, 스트렙토아비딘-표지(Strep-tag), 박테리아 효소 Bir A의 BSP 바이오티나 표적 서열(BSP biotinylation target sequence), 및 항체에 의해 표적되는 에피토프 태그(epitope tags) (예를 들면 c-myc 태그, flag-태그, 및 그와 같은 것)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 당업자에

의해 이해될 수 있듯이, 상기 태그는 정제, 스크리닝, 또는 그 두가지 모두에서 유용하게 사용될 수 있다.

[0162] **항체의 제작(construction) 및 생산(production)**

[0163] 항체는 당업자에게 알려진 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 추가적 항체는 자연적으로 발생항 항체의 효소 또는 화학적 절단(cleavage)에 의해 생산될 수 있다. 본 발명의 인간화된 항체는 비인간 동물(예를 들면, 쥐)의 VH 및/또는 VL 부위로부터 하나 또는 그 이상의 CDR 또는 그들의 부분(portion)을 인간 VH 및/또는 VL 부위로부터 하나 또는 그 이상의 구조 부위(framework regions)로 옮김으로써 제작될 수 있다. 따라서, 선택적으로, VH 및/또는 VL 부위에 있는 인간 구조 잔기는 항체의 면역원성(immunogenicity)을 감소시키거나 및/또는 결합 친화력(binding affinity)을 유지하기 위해 필요하거나 또는 원할 때, 상응하는 비인간(예를 들면, 쥐) 잔기로 대체될 수 있다. 선택적으로, CDR에 존재하는 비인간 아미노산 잔기는 인간 잔기로 대체될 수 있다. 본 발명의 키메라 또는 인간화된 항체는 상기 기술된 것과 같이 제조된 비인간 단일클론 항체(monoclonal antibody)의 서열에 기초하여 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역 글로불린(immunoglobulin)을 암호화하는 DNA는 일반적인 분자 생물학 기술을 이용하여 관심있는 비인간 융합세포(hybridoma)로부터 수득 될 수 있고 비쥐(non-murine) (예를 들면, 인간) 면역 글로불린 서열을 포함하기 위해 조작될 수 있다. 예를 들면, 키메라 항체를 만들기 위해, 당업계에 알려진 방법을 사용하여(예를 들면 미국 특허 No. 4,816,567 Cabilly et al을 참조) 쥐 가변 부위를 인간 불변 부위와 연결할 수 있다. 인간화된 항체를 만들기 위해, 당업계에 알려진 방법을 이용하여 쥐 CDR 부위를 인간 구조(framework)로 삽입할 수 있다(예를 들면, 미국 특허 No. 5,225,539 Winter, 및 미국 특허 Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 Queen et al.를 참조).

[0164] 본 발명의 인간화된 항체는 제작될 수 있고, 여기에서 중쇄 가변 부위를 대한 인간 수용체 분자(human acceptor molecule)는 잠재적인 수용체 분자 가변 부위(potential acceptor molecule variable regions) 및 쥐 항체의 중쇄 가변 부위 사이의 상동성에 대한 고려를 기초로 하여 선택된다. 배선 후보 인간 수용체 분자(germline candidate human acceptor molecule)는 잠재적인 면역원성(immunogenicity)을 감소시키기 위해 바람직하다. 배선 데이터베이스(germline database)는 중쇄 FW3 부위의 말단에서 부분적으로 CDR3 서열까지 읽혀진 항체 서열로 구성되어 있다. FW4 부위를 선택하기 위해, 선택된 배선 분자(selected germline molecule)로부터 유래된 성숙 항체 서열(mature antibody sequence)의 데이터베이스를 이용하여 조사할 수 있고 또는 인간 공여체(human donor)로부터 선택된 배선 분자로부터 유래된 항체 서열을 이용할 수 있다. 바람직하게는, 인간 수용체 분자는 쥐 공여체 분자(donor molecule)와 동일한 중쇄 종류(class), 및 쥐 공여체 분자의 가변 부위의 동일한 표준 구조 종류(canonical structural class)로부터 선택된다. 중쇄 가변 부위에 대한 인간 수용체 분자의 선택을 위한 두 번째 고려사항은 쥐 공여체 분자 및 인간 수용체 분자 사이의 CDR 길이에서의 상동성(homology)을 피하는 것이다. 인간 수용체 항체 분자는 비록 카바트(Kabat) 및 공식 NCBI 데이터베이스(public NCBI database)와 같은 다른 데이터베이스를 이용할 수 있지만, 바람직하게는 V-BASE 데이터베이스에서 상동성 검색에 의해 선택된다.

[0165] 본 발명의 인간화된 항체는 제작될 수 있고, 여기에서 경쇄 가변 부위를 대한 인간 수용체 분자(human acceptor molecule)는 잠재적인 수용체 분자 가변 부위(potential acceptor molecule variable regions) 및 쥐 항체의 경쇄 가변 부위 사이의 상동성에 대한 고려를 기초로 하여 선택된다. 배선 후보 인간 수용체 분자(germline candidate human acceptor molecule)는 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위해 바람직하다. 배선 데이터베이스는 중쇄 FW3 부위의 말단에서 부분적으로 CDR3 서열까지 읽혀진 항체 서열로 구성되어 있다. FW4 부위를 선택하기 위해, 선택된 배선 분자(selected germline molecule)로부터 유래된 성숙 항체 서열(mature antibody sequence)의 데이터베이스를 이용하여 조사할 수 있고 또는 인간 공여체(human donor)로부터 선택된 배선 분자로부터 유래된 항체 서열을 이용할 수 있다. 바람직하게는, 인간 수용체 분자는 쥐 공여체 분자(donor molecule)와 동일한 경쇄 종류(class), 및 쥐 공여체 분자의 가변 부위의 동일한 표준 구조 종류(canonical structural class)로부터 선택된다. 경쇄 가변 부위에 대한 인간 수용체 분자의 선택을 위한 두 번째 고려사항은 쥐 공여체 분자 및 인간 수용체 분자 사이의 CDR 길이에서의 상동성(homology)을 포함한다. 인간 수용체 항체 분자는 비록 카바트(Kabat) 및 공식 NCBI 데이터베이스와 같은 다른 데이터베이스를 이용할 수 있지만, 바람직하게는 V-BASE 데이터베이스에서 상동성 검색에 의해 선택된다. 비인간 항체를 인간화시키는 방법은 하기의 실시예를 포함하여 본 발명에서 기술된다.

[0166] 본 발명은 핵산을 발현시키고 그 항체가 생산될 수 있도록, 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 암호화하는 분리

된 핵산 또는 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 암호화하는 분리된 핵산으로 구성된 벡터(vector)를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것으로 구성된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 생산하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 항체는 분리된다.

[0167] 숙주 세포, 핵산 및 벡터와 같이, 상기 기술된 것은 사용될 수 있다. 핵산의 발현은 상기에 기술되고 당업계에 알려진(예를 들면, Morrison, S. (1985) Science 229:1202를 참조), 예를 들면, 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질도입(gene transfection) 방법의 조합으로써 수득될 수 있다. 예를 들면, 항체, 또는 그것의 단편을 발현시키기 위하여, 부분 또는 전장(full-length)의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA를 일반적인 분자 생물학 기술(예를 들면, 관심 있는 항체를 발현하는 융합세포(hybridoma)를 이용한 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝)에 의해 수득할 수 있고 상기 DNA는 발현 벡터와 같은 벡터에 삽입될 수 있다. 발현 벡터 및 발현 대조군 서열은 사용되는 발현 숙주 세포와 양립될 수 있도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 분리된 벡터로 삽입될 수 있고, 또는 보다 일반적으로, 두가지 유전자 모두 동일한 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 항체 유전자는 표준 방법[예를 들면, 항체 유전자 단편 및 벡터에서 상보적 제한 부위(complementary restriction sites)의 연결(ligation), 또는 제한 부위가 존재하지 않는다면 두가닥 말단 연결(blunt end ligation)에 의해 발현 벡터로 삽입된다. 여기서 기술된 항체의 경쇄 또는 중쇄 가변 부위는 원하는 아형의 중쇄 불변 및 경쇄 불변 부위를 이미 암호화하고 있는 발현 벡터에 그들을 삽입시킴으로써 어떤 항체의 아형(isotype)의 전장(full-length)의 항체 유전자를 만드는데 사용될 수 있다. 즉, VH 부분(segment)은 벡터에서 작용가능하게 CH 부분과 연결되어 있고 VK 부분은 벡터에서 작용가능하게 CL 부분과 연결되어 있다.

[0168] **항-CD19 항체의 특징화(Characterization) 및 정제**

[0169] 본 발명의 항체는 예를 들면, 일반적인 ELISA 또는 라지 종양 세포(Raji tumor cells)와의 결합에 의해 인간 CD19에 대한 결합을 검사할 수 있다. 본 발명의 항체는 당업계에 알려진 다양한 방법으로 분리되거나 또는 정제될 수 있다. 일반적인 정제 방법은 이온 교환(ion exchange), 소수성 결합(hydrophobic interaction), 친화성(affinity), 크기(sizing) 또는 겔 여과(gel filtration), 및 역상(reversed-phase)을 포함하는 크로마토그래피 기술(chromatographic techniques)을 포함하고, FPLC 및 HPLC와 같은 시스템을 이용하여 기압(atmospheric pressure)에서 또는 고압에서 수행된다. 정제 방법은 또한 전기영동의(electrophoretic), 면역의(immunological), 침전(precipitation), 투석(dialysis), 및 크로마토포커싱 기술(chromatofocusing techniques)을 포함한다. 또한, 단백질 농도와 함께, 한외 여과(ultrafiltration) 및 디아여과(diafiltration) 기술도 유용하다. 항-CD19 항체를 정제하기 위하여, 선별된 숙주 세포는 단일클론 항체 정제를 위해 예를 들면 스피너-플라스크(spinner-flasks)에서 자랄 수 있다. 상층액(supernatant)은 단백질 A-세파로오즈(protein A-sepharose) (Pharmacia, Piscataway, NJ)와 함께 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography) 전에 여과될 수 있고 농축될 수 있다. 용리된 IgG는 그 순도(purity)를 알아보기 위하여, 겔 전기영동(gel electrophoresis) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC)에 의하여 검사될 수 있다.

[0170] **면역접합체(immunoconjugates)**

[0171] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포 독소(cytotoxin), 약물[예를 들면, 면역 억제제(immunosuppressant)] 또는 방사성 독물(radiotoxin)과 같은 치료제(therapeutic agent)와 연결된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항-CD19 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 여기서 상기 접합체는 "면역접합체(immunoconjugate)"를 의미한다. 하나 또는 그 이상의 세포 독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소(immunotoxin)"을 의미한다. 세포독소 또는 세포독소제(cytotoxic agent)는 세포에 치명적인(예를 들면, 세포를 죽이는) 어떤 물질(agent)을 포함한다. 예에는 탁솔(taxol), 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D(gramicidin D), 에티듐 브로마이드(ethidium bromide), 에머틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 도소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 다이하이드록시 안트라신 디오네(dihydroxy anthracin dione), 미토산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 액티노마이신 D(actinomycin D), 1-디하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로파놀올(propranolol), 및 푸로마이신(puromycin) 및 그것의 유사체(analogs) 또는 그것의 상동체(homologs)가 있다. 또한 치료제는, 예를 들면, 항대사성 물질(antimetabolites) [예를 들면, 메토폭사트(methotrexate), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 사이타라빈

(cytarabine), 5-플루오로우라실 데카바진(5-fluorouracil decarbazine)], 알킬화제(alkylating agents) [예를 들면, 메클로레타민(mechlorethamine), 티오에파 클로로암부실(thioepa chlorambucil), 멜파란(melphalan), 카르무스타인(carmustine; BSNU) 및 로무스타인(lomustine; CCNU), 사이클로토스파미드(cyclophosphamide), 부숴판(busulfan), 다이브로모만니톨(dibromomannitol), 스트렙토조토신(streptozotocin), 미토마이신 C(mitomycin C), 및 시스-다이클로로디아민 플라티늄(II) (cis-dichlorodiamine platinum (II); DDP) 시스플라틴(cisplatin)], 안트라사이클린(anthracyclines) [(예를 들면, 다우노루비신(daunorubicin) {예전에는 다우노마이신(daunomycin)} 및 독소루비신(doxorubicin)], 항생제(antibiotics) [예를 들면, 닥티노마이신(dactinomycin) {(예전에는 액티노마이신(actinomycin)}, 블레오마이신(bleomycin), 미트라마이신(mithramycin), 및 안트라마이신(anthracycline; AMC)], 및 항-유사분열제(anti-mitotic agents) [예를 들면, 빈크리스틴(vincristine) 및 빈블라스틴(vinblastine)]를 포함한다. 본 발명의 항체에 연결될 수 있는 치료 세포 독소(therapeutic cytotoxin)의 다른 예는 듀오카르마이신(duocarmycins), 칼리키미신(calicheamicins), 마이탄사인(maytansins) 및 아우리스타틴(auristatins), 및 그것의 유도체(derivatives)를 포함한다. 칼리키미신(calicheamicins) 항체 접합체의 예는 상업적으로 이용가능하다(Myotarg(R); American Home Products). 세포 독소는 당업계에서 이용가능한 링커 기술(linker technology)본 발명의 항체와 연결될 수 있다. 항체에 세포 독소를 접합시키는데 사용되는 링커 종류의 예는 하이드라존(hydrazones), 티오에테르(thioethers), 에스테르(esters), 이황화물(disulfides) 및 펩티드-포함하는 링커(peptide-containing linkers)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 링커는 즉, 예를 들면, 리소솜 구역(lysosomal compartment)에서 낮은 pH에 의해 절단(cleavage)되는 또는 카텝신(cathepsins) (예를 들면, 카텝신 B, C, D)와 같이 종양 조직(tumor tissue)에서 우선적으로 발현하는 단백질 분해효소와 같은 단백질 분해효소(protease)에 의해 절단되는 것이 선택될 수 있다. 나아가 세포 독소의 종류에는, 링커 및 치료제를 항체에 접합시키는 방법은 Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264를 참조한다. 또한 본 발명의 항체는 세포 독성 방사성 의약품(cytotoxic radiopharmaceuticals), 또는 방사성 면역접합체(radioimmunoconjugates)라고 불리는 것을 생성하기 위하여 방사성 동위원소(radioactive isotope)에 연결시킬 수 있다. 진단(diagnostically)을 위해 또는 치료적(therapeutically) 사용을 위한 항체에 접합할 수 있는 방사성 동위원소의 예는 요오드(iodine)<131>, 인듐(indium)<111>, 이트륨(yttrium)<90> 및 루테튬(lutetium)<177>을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 방사성 면역접합체를 제조하기 위한 방법은 당업계에 알려져 있다. 방사성 면역접합체의 예는 상업적으로 이용가능하고, 제발린[Zevalin(R)] (EDEC Pharmaceuticals) 및 벅사[Bexxar(R)] (Corixa Pharmaceuticals)를 포함하며, 유사한 방법은 본 발명의 항체를 이용하여 방사성 면역접합체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 항체 면역접합체는 주어진 생물학적 반응을 변화시키는데(modify) 사용될 수 있고 상기 약물 모이어티(moiety)는 고전적 화학 치료제(classical chemical therapeutic agents)로 제한되어 이해되지 않는다. 예를 들면, 약물 모이어티는 바람직한 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질은 아브린(abrin), 리신 A(ricin A), 수도모나스 엑소톡신(pseudomonas exotoxin), 또는 디프테리아 독소(diphtheria toxin)와 같은 효소적으로 활성화된 독소, 또는 그것의 활성화된 단편; 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor) 또는 인터페론-[감마](interferon-[gamma])와 같은 단백질; 또는, 림포카인(lymphokines), 인터루킨-1(interleukin-1; IL-1), 인터루킨-2(interleukin-2; IL-2), 인터루킨-6(interleukin-6; IL-6), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor; GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(granulocyte colony stimulating factor; G-CSF), 또는 다른 성장 인자(growth factors)와 같은 생물학적 반응 조절제(biological response modifiers)를 포함할 수 있다. 상기 치료제를 항체에 연결시키기 위한 기술은 잘 알려져 있고, 예를 들어, Arnon et al, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe et al, Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)를 참조한다.

[0172] **약학적 조성물(Pharmaceutical Compositions)**

[0173] 또 다른 측면에서, 본 발명은 조성물, 예를 들면, 본 발명의 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 운반체(carrier)로 구성된 약학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 본 발명의 하나 또는 항체 또는 면역접합체의 조합(예를 들어, 두 개 또는 그 이상 상이한 것)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 약학적 조성물은 표적 항원(antigen)에 있는 상이한 에피토프(epitope)에 결합하거나 또는 상보적 활성(complementary activities)을 갖는 항체(또는 면역접합체)의 조합으로 구성될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 병용 요법(combination therapy)에서, 즉 다른 물질(agent)와 함께 투여될 수 있다. 예를 들면, 병용 요법은 최소한 하나의 다른 항-염증제(anti-inflammatory agent) 또는 면역억제제(immunosuppressant agent)와 함께 본 발명의 항-CD19 항체를 포함할 수 있다.

[0174] 여기서 사용되는 "약학적으로 허용 가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 생리학적으로 양립할 수 있는(compatible) 어떤 및 모든 용제(solvent), 분산매(dispersion media), 코팅(coatings), 항박테리아(antibacterial) 및 항균제(antifungal agent), 등장성(isotonic) 및 흡수 지연제(absorption delaying agent), 및 그와 같은 것을 포함한다. 바람직하게, 상기 운반체는 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 피하(subcutaneous), 비경구(parenteral), 척수(spinal) 또는 상피(epidermal) 투여에[예를 들면, 주입(injection) 또는 투입(infusion)에 의해서] 적합하다. 투여 경로(route)에 따라, 활성 화합물, 즉 항체 또는 면역접합체는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산(acid) 및 다른 자연조건(natural condition)의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위해 물질(material)로 코팅될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 멸균된 주입가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위해 멸균 수용액(sterile aqueous solutions) 또는 분산(dispersions) 및 멸균 파우더(sterile powders)를 포함한다. 약학적 활성 물질(pharmaceutically active substances)을 위한 상기 매질(media) 및 물질(agent)의 사용은 당업계에 알려져 있다. 어떤 일반적인 매질(conventional media) 또는 물질(agent)이 활성 화합물과 양립하지 않는다는 것에 대해서 제외하고, 본 발명의 약학적 조성물에서 그들의 사용은 예상될 수 있다. 또한 보충 활성 화합물(supplementary active compounds)은 조성물로 통합될 수 있다.

[0175] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료제와 연결된 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 또는 그것의 단편 및 약학적으로 허용 가능한 운반체로 구성된 면역접합체를 포함하는 조성물을 제공한다. 사용될 수 있는 면역접합체 및 치료제(therapeutic agent)는 상기에 기술되었다.

[0176] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 항산화제(antioxidant)를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 항산화제의 예는 하기를 포함한다: (1) 아스코르브 산(ascorbic acid), 시스테인 염산염(cysteine hydrochloride), 중아황산 나트륨(sodium bisulfate), 메타중아황산 나트륨(sodium metabisulfite), 아황산 나트륨(sodium sulfite) 및 그와 같은 것과 같이 물에 용해 가능한 항산화제; (2) 팔미트산 아스코르빌(ascorbyl palmitate), 부틸 히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole; BHA), 부틸 히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene; BHT), 레시틴(lecithin), 갈산 프로필(propyl gallate), 비타민 E(alpha-tocopherol), 및 그와 같은 것과 같이 기름(oil)에 용해 가능한 항산화제; (3) 시트르산(citric acid), 에틸렌디아민 테트라아세트산(ethylenediamine tetraacetic-acid; EDTA), 소르비톨(sorbitol), 타르타르산(tartaric acid), 인산(phosphoric acid), 및 그와 같은 것과 같이 금속 킬레이팅제(metal chelating agents). 본 발명의 약학적 조성물에 적용될 수 있는 적절한 수용성 및 비수용성 운반체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(polyols) [예를 들면 글리세롤(glycerol), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 및 그와 같은 것], 및 적절한 그들의 혼합물, 올리브 기름(olive oil)과 같은 식물성 기름(vegetable oils), 및 에틸 올레산(ethyl oleate)과 같은 주입 가능한 유기 에스테르(injectable organic esters)를 포함한다. 예를 들면, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅물질(coating material)을 이용함으로써, 분산(dispersion)의 경우에 요구되는 입자 크기(required particle size)를 유지함으로써, 및 계면활성제(surfactant)를 사용함으로써 적당한 유동성(fluidity)이 유지될 수 있다. 또한 상기 조성물은 방부제(preservatives), 습윤제(wetting agent), 유화제(emulsifying agents) 및 분산제(dispersing agent)와 같은 보강제(adjuvant)를 포함할 수 있다. 미생물의

존재에 대한 예방은 상기 멸균 과정에 의해, 및 다양한 항박테리아 및 항균제, 예를 들면 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀 소르브산(phenol sorbic acid), 및 그와 같은 것에 의한 두 가지 모두에 의해서 보장될 수 있다. 당(sugar), 염화 나트륨(sodium chloride), 및 그와 같은 것과 같은 등장제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 게다가, 주입 가능한 약학적 형태의 장기적인 흡수는 스테아린산 알루미늄(aluminum monostearate) 및 젤라틴(gelatin)이 흡수를 지연시키는 물질(agent)의 포함에 의해 조래되었을 수 있다.

[0177] 치료의 및 다른 용도

[0178] 본 발명의 인간화된 항체는 CD19 매개 질환(disorder)의 진단 및 치료에 관련된 시험관내(in vitro) 및 생체내(in vivo)에서 수많은 진단의 및 치료의 용도를 갖는다. 예를 들면, 상기 분자는 배양되는(in culture), 시험관내(in vitro) 또는 생체외(ex vivo)에서 세포에게, 또는 예를 들면 생체내(in vivo)에서 인간 개체에 CD19에 의해 매개된 다양한 질환을 치료, 예방 및 진단하기 위해 투여될 수 있다. 선호되는 개체는 인간이고 CD19의 활성화에 의해 매개되는 질환(CD19에 의해 매개되는 질환)을 갖는 환자를 포함한다. 구체적으로, 상기 방법은 비정상적인(abberant) B 세포 집단과 관련된 CD19에 의해 매개되는 질환을 갖는 인간 환자를 치료하기에 적당하다.

[0179] 본 발명의 목적에 대해 "환자(patient)"는 인간 및 다른 동물은 포함하고, 바람직하게는 포유류이고 가장 바람직하게는 인간이다. 따라서 본 발명의 항체는 인간 치료요법(therapy) 및 가축병 치료와 관련된(veterinary) 적용 모두를 갖는다. 본 발명에서 "치료(treatment)" 또는 "치료하는 것(treating)"라는 용어는 질병(disease) 또는 질환(disorder)에 대한 치료요법 상의 치료(therapeutic treatment)", 뿐만 아니라 예방, 또는 억제 방법을 포함하는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들면, 질병의 시작 전에 항체의 성공적인 투여는 그 질병의 치료를 야기한다. 다른 예로서, 질병의 임상적 징후 이후에, 질병의 증상을 없애기 위한 항체의 성공적인 투여는 질병의 치료를 포함한다. 또한, "치료(treatment)" 또는 "치료하는 것(treating)"는 질병이 나타난 후에, 상기 질병을 근절하기 위하여 항체를 투여하는 것을 포함한다. 질병의 시작 후 및 임상적 증상 후, 항체의 성공적인 투여는 임상적 증상의 가능한 완화(abatement) 및 가능하게는 질병의 경감(amelioration)과 함께 발달되었고, 질병의 치료를 포함한다. 상기 "치료의 필요시(in need of treatment)"는 이미 질병 또는 질환을 갖는 포유류, 뿐만 아니라 질병이나 질환이 예방되어야 하는 포유류를 포함하여, 질병이나 질환을 갖는 경향을 보이는 포유류를 포함한다.

[0180] 어떤 실시예에서, 인간화된 항체는 CD19에 의해 매개되는 다양한 질병을 치료, 예방 또는 진단하기 위해 생체내(in vivo)에서 사용된다. 따라서, 본 발명은 개체(subject)에서 CD19에 의해 매개되는 질환을 치료하기 위한 방법, 치료적으로 효과적인 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 양을 개체에게 투여하는 것으로 구성되는 방법을 제공한다.

[0181] 예시로서 CD19에 의해 매개되는 질환은 류머티스성 관절염을 포함한 자가면역 질환(autoimmune disorder), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemias; ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemias; CLL), 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemias), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 악성 거대 세포 림프종(anaplastic large-cell lymphomas; ALCL), 피부 T 세포 림프종(cutaneous T-cell lymphomas), 혹 작은 절단 세포 림프종(nodular small cleaved-cell lymphomas), 말초 T 세포 림프종(peripheral T-cell lymphomas), 레네르트 림프종(Lennert's lymphomas), 면역아세포 림프종(immunoblastic lymphomas), T 세포 백혈병/림프종(T-cell leukemia/lymphomas; ATLL), 성인 T 세포 백혈병(adult T-cell leukemia; T-ALL), 엔트로블라스틱/센트로블라스틱 여포 림프종 암[entroblastic/centrocytic(cb/cc) follicular lymphomas cancers], B 계통의 범발성 거대 세포 림프종(diffuse large cell lymphomas of B lineage), 혈관면역아세포성 림프절증-같은 T 세포 림프종(angioimmunoblastic lymphadenopathy; AILD-like T cell lymphoma), HIV와 관련된 체강에 근거한 림프종(HIV associated body cavity based lymphomas), 태아 상피성암(Embryonal Carcinomas), 리노-파린스의 미분화 상피성암(undifferentiated carcinomas of the rhino-pharynx) [예를 들면, 쉬민케 종양(Schmincke's tumor)], 캐슬먼 질병(Castleman's disease), 카포시 육종(Kaposi's Sarcoma), 다발성 골수종(multiple myeloma), 발던스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 항-CD20 항체 내성 B 세포 암(anti-CD20 antibody resistant B-cell cancers) 및 다른 B 세포 림프종(B-cell lymphomas) 및 백혈병(leukemias)을 포함

한다. 항-CD20 항체 내성 B 세포 암(Anti-CD20 antibody resistant B-cell cancers)은 예를 들면 이투스마브 [rituximab (Rituxan®) 내성 B 세포 암인데, 이것은 바람직한 항-CD20 항체 내성 B 세포 암이다. 바람직한 암은 혈액암(hematologic cancer), 특히 림프종 및 백혈병과 관련된 CD19를 발현하는 암이고, 구체적으로 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemias; ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemias; CLL), 및 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemias)이다. 본 발명의 항체로 치료되는 바람직한 CD19 매개 질환은 비호지킨 림프종, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 및 모발상 세포 백혈병, 류머티스성 관절염, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 및 항-CD20 항체 내성 B 세포 암으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 항체로 치료되는 보다 더 바람직한 CD19에 매개되는 질환은 류머티스성 관절염, 비호지킨 림프종 또는 항-CD20 항체 내성 B 세포 암이다.

[0182]

"자가면역 질환(autoimmune disorders)"은 동종이형 소도 이식 거부(allogenic islet), 원형 탈모증(alopecia areata), 강직척추염(ankylosing spondylitis), 항인지질증후군(antiphospholipid syndrome), 자가면역 애디슨 질환(autoimmune Addison's disease), 항호중구 세포질 자기항체(antineutrophil cytoplasmic autoantibodies; ANCA), 부신(adrenal gland)의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 자가면역 심근염(autoimmune myocarditis), 자가면역 호중성 백혈구 감소증(autoimmune neutropenia), 자가면역 난소염(autoimmune oophoritis) 및 고환염(orchitis), 자가면역 혈소판 감소증(autoimmune thrombocytopenia), 자가면역 두드러기(autoimmune urticaria), 베체트 질환(Behcet's disease), 물집유사천포창(bullous pemphigoid), 심근병증(cardiomyopathy), 캐슬먼 증후군(Castleman's syndrome), 복강 스프루스-피부염(celiac spruce-dermatitis), 만성피로 면역 장애 증후군(chronic fatigue immune dysfunction syndrome), 만성 염증 탈수초성 다발성 신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 추르그-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 유천포창(cicatricial pemphigoid), 크레스트 증후군(CREST syndrome), 한랭응집질환(cold agglutinin disease), 크론 질환(Crohn's disease), 피부근육염(dermatomyositis), 원판상루푸스(discoid lupus), 원발성 혼합 한냉-글로불린증(essential mixed cryoglobulinemia), 제8인자 결핍증(factor VIII deficiency), 섬유근통증(fibromyalgia-fibromyositis), 토리콩팥염(glomerulonephritis), 그레이브 질환(Grave's disease), 길리안-바르(Guillain-Barre), 굿파스처증후군(Goodpasture's syndrome), 이식편대숙주병(graft- versus-host disease; GVHD), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), A형 혈우병(hemophilia A), 특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis), 특발성 혈소판 감소 자반병(idiopathic thrombocytopenia purpura; ITP), IgA 신경병증(IgA neuropathy), IgM 다중신경병증(IgM polyneuropathies), 면역 매개 혈소판 감소증(immune mediated thrombocytopenia), 연소성 관절염(juvenile arthritis), 카와사키 질병(Kawasaki's disease), 편평태선(lichen planus), 루푸스 에르테마토시스(lupus erythematosus), 메니에르 질병(Meniere's disease), 혼합 조직 질병(mixed connective tissue disease), 다발 경화증(multiple sclerosis; MS), 타입 1 인슐린 의존 당뇨병(type 1 diabetes mellitus), 중증근육 무력증(myasthenia gravis), 보통 천포창(pemphigus vulgaris), 악성 빈혈(pernicious anemia), 결절다발동맥염(polyarteritis nodosa), 다발연골염(polychondritis), 다중선 증후군(polyglandular syndromes), 류마티스성 다발성 근육통(polymyalgia rheumatica), 다발근육염(polymyositis) 및 피부근육염(dermatomyositis), 원발성 아감마글로비누레미아(primary agammaglobulinemia), 원발성 담즙성 간경변(primary biliary cirrhosis), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 레이널드 현상(Reynauld's phenomenon), 레이터 증후군(Reiter's syndrome), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis; RA), 우육종증(sarcoidosis), 경피증(scleroderma), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 고체 기관 이식 거부(solid organ transplant rejection), 피부경직 증후군(stiff-man syndrome), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus; SLE), 타카야스 동맥염(takayasu arteritis), 관자동맥염(temporal arteritis) / 거대세포 동맥염(giant cell arteritis), 혈전성 혈소판 감소 자반병(thrombotic thrombocytopenia purpura), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 포도막염(uveitis), 피부염 허피티포미스 혈관염(dermatitis herpetiformis vasculitis)와 같은 맥관염(vasculitides), 백반증(vitiligo), 항-호중구 세포질 항체 관련된 혈관염(anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis), 이식대숙주 질병(graft vs. host disease), 한랭글로불린혈증(cryoglobulinemia), IgM 매개 신경병(IgM mediated neuropathy), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 특발성 막성콩팥병(idiopathic membranous nephropathy), 안간대 간대성근경련(opsoclonus myoclonus), 및 웨그너 육아종증(Wegner's granulomatosis)을 포함한다.

- [0183] 또한, 다양한 종양 세포에서 CD19의 발현 및 본 발명의 인간화된 항체 또는 그것의 단편이 상기에 기술한 것과 같이 CD19를 발현하는 악성 B 세포의 증식을 억제한다는 사실을 보면, CD19 매개 질병은 암과 같은, 예를 들면 CD19를 발현하는 종양 세포의 존재로 특징화 되는 질환, 예를 들면, 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma; NHL), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemias; ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemias; CLL), 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemias), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 악성 거대 세포 림프종(anaplastic large-cell lymphomas; ALCL), 다발성 골수종(multiple myeloma), 피부 T 세포 림프종(cutaneous T-cell lymphomas), 혹 작은 절단 세포 림프종(nodular small cleaved-cell lymphomas), 말초 T 세포 림프종(peripheral T-cell lymphomas), 레네르트 림프종(Lennert's lymphomas), 면역아세포 림프종(immunoblastic lymphomas), T 세포 백혈병/림프종(T-cell leukemia/lymphomas; ATLL), 성인 T 세포 백혈병(adult T-cell leukemia; T-ALL), 엔트로블라스틱/센트로블라스틱 여포 림프종 암[entroblastic/centrocytic(cb/cc) follicular lymphomas cancers], B 계통의 범발성 거대 세포 림프종(diffuse large cell lymphomas of B lineage), 혈관면역아세포성 림프절증-같은 T 세포 림프종(angioimmunoblastic lymphadenopathy; AILD-like T cell lymphoma), HIV와 관련된 체강에 근거한 림프종(HIV associated body cavity based lymphomas), 태아 상피성암(Embryonal Carcinomas), 리노-파린스의 미분화 상피성암(undifferentiated carcinomas of the rhino-pharynx) [예를 들면, 쉬민케 종양(Schmincke's tumor)], 캐슬먼 질병(Castleman's disease), 카포시 육종(Kaposi's Sarcoma), 다발성 골수종(multiple myeloma), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 항-CD20 항체 내성 B 세포 암(anti-CD20 antibody resistant B-cell cancers) 및 다른 B 세포 림프종(B-cell lymphomas) 및 백혈병(leukemias)과 같은 종양 형성 질환(tumorigenic disorder)이 바람직하다.
- [0184] 따라서, 또 다른 측면에서 본 발명은 CD19를 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 이것은 상기 세포를 종양 세포의 성장을 억제하는데 효과적인 양의 본 발명의 인간화된 항체 또는 그것의 단편에 접촉시키는 것을 포함한다. 종양 세포는 일반적으로 인간 버킷 림프종 세포(human Burkitt lymphoma cells), 인간 B 세포 선구체 백혈병 세포(human B cell precursor leukemia cells), 인간 B 세포 백혈병 세포(human B cell leukemia cells) 또는 인간 B 세포 림프종 세포(human B-cell lymphoma cells), 바람직하게는 인간 버킷 림프종 세포 또는 인간 B 세포 림프종 세포로부터 선택된다.
- [0185] 본 발명의 인간화된 항체 또는 그의 단편이 혈액에서 B 세포 고갈을 초래한다는 것으로 볼 때, 본 발명은 나아가 개체로부터의 B 세포를 고갈시키기에 효과적인 양의 본 발명의 인간화된 항체 또는 그의 단편을 개체(subject)에게 투여하여 개체에서 B 세포를 고갈시키는 방법을 제공한다.
- [0186] 어떤 실시예에서, 본 발명의 항체는 CD19의 수준(level), 또는 세포막 표면에 CD19를 갖고 있는 세포의 수준(level)을 탐지하기 위해 사용될 수 있고, 이 수준은 특정 질병 증상과 연결될 수 있다. 그렇지 않으면, 항체는 CD19의 기능을 억제하거나 차단하기 위해 사용될 수 있고, 이것은 다시, 특정 질병 증상의 예방 또는 완화와 연결될 수 있으므로, 질병의 매개자(mediator)로서의 CD19를 시사한다. 이것은 항체 및 CD19 사이의 복합체(complex)가 형성할 수 있는 조건하에서 샘플(sample) 및 대조군 샘플(control sample)이 항-CD19 항체와 접촉함으로써 야기될 수 있다. 항체 및 CD19 사이에서 형성된 어떤 복합체(complex)는 탐지되고 샘플 및 대조군 샘플에서 비교된다. 본 발명의 항체가 CD19와의 특이적 결합에서, 본 발명의 항체는 세포 표면에서의 CD19 발현을 특이적으로 탐지하는데 사용될 수 있고, 또한 면역친화성 정제(immunoaffinity purification)를 통해 CD19를 정제하는데 사용될 수 있다.
- [0187] 어떤 실시예에서, 본 발명의 항체는 처음에 시험관내에서(in vitro) 치료의 또는 진단의 용도와 관련된 결합 활성(binding activity)를 위해 검사될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물은 하기의 실시예에 기술된 세포 유동 분석(flow cytometric assays)을 사용하여 검사될 수 있다.
- [0188] 또한 본 발명은 약제(medicament)로서의 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 용도 및 CD19에 의해 매개되는 질환

의 치료를 위한 약제의 제조에서 인간화된 항체 또는 그것의 단편의 용도를 제공한다. 어떤 실시예에서 본 발명은 약제로서 사용을 위한 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. 또한 본 발명은 CD19에 의해 매개되는 질병을 치료하기 위한 방법에서의 사용을 위한 인간화된 항체 또는 그것의 단편을 제공한다. CD19에 의해 매개되는 질환은 상기에 기술된 것들이다.

[0189] 상기에 기술되었듯이, 본 발명의 인간 항-CD19 항체는 하나 또는 그 이상의 다른 치료제, 예를 들면 세포 독소제(cytotoxic agent), 방사성 독소제(radiotoxic agent) 또는 면역억제제(immunosuppressive agent)와 함께 투여될 수 있다. 상기 항체는 물질(agent)과 연결될 수도 있고[면역복합체(immunocomplex)로서] 또는 물질(agent)로부터 분리되어 투여될 수도 있다. 후자의 경우에(분리된 투여), 상기 항체는 물질(agent)와 전, 후 또는 동시에 투여될 수 있고 또는 다른 알려진 치료요법, 예를 들면, 방사성과 같은 항암 치료법(anti-tumor therapy)과 함께 투여될 수 있다.

[0190] 항체의 투여를 위하여, 그 용량(dosage)은 숙주 몸무게의 0.0001 내지 100mg/kg의 범위이고, 보다 일반적으로는 0.01 내지 10mg/kg이다. 예시적인 치료제제(regime)는 1 주일에 한번, 매(every) 2 주일에 한번, 매 3 주일에 한번, 매 4주일에 한번, 1 달에 한번, 매 3 개월마다 한번, 매 3 내지 6개월에 한번 투여하는 것을 수반한다. 항체는 일반적으로 다수의 경우에 투여된다. 예를 들면, 단일 용량(single dosage)의 간격(interval)은 주(weekly), 달(monthly), 매 3달, 또는 매년(yearly)이 될 수 있다. 또한, 환자의 표적 항원에 대한 항체의 혈액 수준(blood level)을 측정하여 나오는 값에 따라 간격은 비규칙적이고(irregular)일 수 있다. 일부 방법에서는, 용량은 약 1-1000 µg/ml, 어떤 방법에서는 약 25-300 µg/ml의 혈장 항체 농도(plasma antibody concentration)에 이르기 위해서 조절된다. 그렇지 않으면, 항체는 지속적인 분비 형성(sustained release formulation)으로서 투여될 수 있는데, 이는 낮은 빈도 투여(frequent administration)가 요구되는 경우이다. 용량 및 빈도는 환자에서의 항원 반감기(half-life)에 따라서 다양하다. 투여 용량 및 빈도는 치료가 예방을 위한 것인지 또는 치료를 위한 것인지에 따라 다양할 수 있다. 예방을 위한 적용에서는, 오랜 기간 동안 상대적으로 낮은 용량이 상대적으로 드문(infrequent) 간격에서 투여된다. 어떤 환자는 그들의 남은 삶을 위해 치료를 계속 받는다. 치료를 위한 적용에서는, 그 질병이 경감되거나 종료될 때까지, 가끔 상대적으로 높은 용량이 상대적으로 짧은 간격에서 요구된다.

[0191] 활성 성분(active ingredient), 즉 본 발명의 약학적 조성분에서 항체의 실제 용량 수준(actual dosage level)은 환자에게 독성을 나타내지 않으면서, 특정 환자에게 원하는 치료 반응(therapeutic response)을 얻기 위한 효과적인 활성 성분의 양, 조성물, 및 투여 방법을 얻기 위하여 다양할 수 있다. 그 선택된 용량 수준은 본 발명에 적용된 특정 조성물의 활성, 투여 방법, 투여 시간, 적용되는 특정 항체의 배설률(rate of excretion), 치료의 지속기간(duration), 다른 약물, 적용되는 특정 조성물과 함께 사용되는 화합물 및/또는 물질(material), 나이, 성별, 무게, 조건, 일반적인 건강상태 및 치료되는 환자의 이전 의료 기록, 및 의학계에서 잘 알려진 그와 같은 요소를 포함하는 다양한 약학적 반응 속도의 요소에(pharmacokinetic factors) 의존한다.

[0192] 본 발명의 항-CD19 항체의 "치료적으로 효과있는 양(therapeutically effective amount)"는 바람직하게 질병 증상의 고통정도(severity)를 경감, 질병의 증상에서 자유로운 기간의 빈도(frequency) 및 지속기간(duration) 증가, 및/또는 질병의 고통(affliction) 때문에 나타나는 손상(impairment) 또는 장애(disability)를 예방시키는 결과를 가져온다. 예를 들면, 암형성 질환(tumorigenic disorder) (CD19<+> tumors)의 치료를 위해, "치료적으로 효과있는 양"은 치료받지않는 개체(untreated subject)에 비해, 세포 성장을 억제 또는 종양 성장을 바람직하게는 최소 20%, 보다 바람직하게는 최소 40%, 보다 더 바람직하게는 최소 60%, 그리고 그보다 더욱 바람직하게는 최소 80%를 억제한다. 종양의 성장을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효과를 예측할 수 있는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 그렇지 않으면, 조성물의 상기 특성은 세포 성장을 억제하는 화합물의 능력을 검사함으로써 평가될 수 있고, 상기 억제 능력은 당업자에게 알려진 검사법(assay)에 의해 시험관 내(in vitro)에서 측정될 수 있다. 치료 화합물(therapeutic compound)의 치료적으로 효과적인 양은 종양의 크기를 감소시킬 수 있고, 또는 그렇지 않으면 개체의 증상을 완화시킬 수 있다. 당업계에서 평이한(ordinary) 기술 중 하나는 개체의 크기, 개체 증상의 심각한 정도(the severity of the subject's symptoms), 및 특정 조성물 또는 선택된 투여 경로에 근거하여 상기 치료적으로 효과적인 양을 결정할 수 있다.

[0193] 본 발명의 항체 또는 그 조성물은 당업계에 잘 알려진 하나 또는 그 이상의 다양한 방법을 이용하여 하나 또는 그 이상의 투여경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해될 수 있듯이, 투여 경로 및/또는 방법은 원하는 결과에 따라 다양할 것이다. 바람직한 투여 경로는 예를 들면, 주입(injection) 또는 투입(infusion)에 의한, 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 피내(intradermal), 복강내(intraperitoneal) 피하(subcutaneous), 척수(spinal) 또는 비경구(parenteral)의 투여 경로를 포함한다. 보다 바람직하게, 투여 경로는 정맥내 또는 피하이다. 여기서 사용되는 "비경구투여(parenteral administration)"의 표현은 대개 주입(injection)에 의한, 장(enteral) 및 국소(topical) 투여를 제외한 다른투여 방법을 의미하고, 제한없이, 정맥내, 근육내, 동맥내(intraarterial), 척추강내(intrathecal), 포내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내(intracardiac), 피내(intradermal), 복강내(intraperitoneal), 경기관(transtracheal), 피하(subcutaneous), 각피하(subcuticular), 관절내(intraarticular), 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내(intraspinal), 경막외(epidural) 및 흉골내(intrasternal) 주입 및 투입을 포함한다. 그렇지 않으면, 본 발명의 항체는 국소(topical), 상피(epidermal) 및 점막(mucosal) 투여 경로와 같은 비경구(non-parenteral) 경로를 통하여, 예를 들면 비강내(intranasally), 경구적(orally), 질(vaginal), 직장(rectal), 설하(sublingual) 또는 국소(topically)으로 투여될 수 있다.

[0194]

[0195] **제조물품(article of manufacture) 및 키트(kit)**

[0196] 본 발명의 어떤 실시예에서, CD19에 의해 매개되는 질환을 치료하기 위한 본 발명의 인간화된 항체 또는 그것의 단편, 조성물 또는 면역접합체로 구성된 제조물품이 제공된다. 제조물품은 용기(container) 및 용기에 관련되거나 또는 용기에 있는 표지(label) 또는 패키지(package) 삽입으로 구성될 수 있다. 예를 들면, 적절한 용기는 병(bottles), 바이알(vials) 또는 주사기(syringe)가 포함된다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 질환을 치료하는데 효과적일 수 있는 조성물을 담고 멸균된 접근 포트(access port)를 갖을 수 있다[예를 들면, 용기는 정맥내 용액 자루(intravenous solution bag) 또는 피하 주입 바늘(hypodermic injection needle)에 의해 뚫을 수 있는 정지기(pierceable stopper)를 갖는 바이알 일 수 있다]. 조성물에서 최소 하나의 활성 물질(active agent)은 여기에서 기술된 인간화된 항체일 수 있다. 표지 또는 패키지 삽입은 조성물이 암과 같은 선택의 질환을 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 가르킬 수 있다. 어떤 실시예에서, 표지 또는 패키지 삽입은 인간화된 항체로 구성된 조성물을 CD19에 의해 매개되는 질환을 치료하는데 사용할 수 있다는 것을 가르킬 수 있다.

[0197]

게다가, 제조물품은 첫번째 그 안에 포함된 조성물 용기, 여기에서 그 조성물은 여기의 인간화된 항체로 구성되고, 및 두번째 그 안에 포함된 조성물 용기를 포함할 수 있고, 두번째 용기에서 조성물은 인간화된 항체가 아닌 치료제(therapeutic agent)로 구성된다. 본 발명의 이 실시예에서 제조물품은 첫번째 및 두번째 조성물이 CD19에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하기 위해 조합되어 사용될 수 있다는 것을 가르키는 패키지 삽입으로 구성될 수 있다. 상기 치료제는 상기 부분(section)에서 기술된 그 어떤 부가적 치료요법[예를 들면, 혈전용해제(thrombolytic agent), 항혈소판제(antiplatelet agent), 화학요법제(chemotherapeutic agent), 항혈관생성제(antiangiogenic agent), 항호르몬 화합물(antihormonal compound), 심보호제(cardiacprotectant), 및/또는 포유류에서 사이토카인(cytokine)을 포함한 면역 기능 조절제]일 수 있다. 그렇지 않으면, 또는 첨가적으로, 제조물품은 약학적으로 허용 가능한 버퍼(buffer), 예를 들면 주입을 위한 박테리아 생장 저지 물(bacteriostatic water for injection; BWFI), 인산완충액(phosphate-buffered saline; PBS), 링거 용액(Ringer's solution) 및 덱스트로즈 용액(dextrose solution)과 같은 버퍼를 포함한 두번째(또는 세번째) 용기로 구성될 수 있다. 또한, 이것은 다른 버퍼, 희석제(diluent), 여과(filter), 바늘(needle), 및 주사기를 포함한 사용자 관점 및 상업품(commercial)으로부터의 바람직한 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0198]

또한 본 발명의 관점에서, 키트(kit)는 본 발명의 항체, 조성물 또는 면역접합체 및 사용을 위한 설명(instruction)를 포함한다. 상기 키트는 면역억제제, 세포 독소제 또는 방사성 독소제와 같은 하나 또는 그 이상의 추가 시약(reagent), 또는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 추가적 인간화된 항체(예를 들면, 처음 인간화된 항체로부터 구별되는 CD19 항원에서의 에피토프에 결합하는 상보적 활성을 갖는 인간화된 항체)를 포함할 수 있다.

- [0199] 물질의 위탁(deposit of material)
- [0200] 하기의 물질은 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ) (Inhoffenstr), 7 B, 38124 Braunschweig, German)에 기탁되었다:
- [0201] 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 어세션 넘버(accession No). DSM 23303를 갖는 미생물(E.coli)은 실시예 1에 기술되어 있듯이, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 FMC63 변이의 경쇄 암호화 서열로 구성된 분리되어 있는 핵산을 포함한다. 2010년 2월 5일에 독일생물자원은행(DSMZ)에 기탁된 어세션 넘버(accession No). DSM 23302를 갖는 미생물(E.coli)은 실시예 1에 기술되어 있듯이, 인간 CD19에 결합하는 인간화된 항체 FMC63 변이의 중쇄 암호화 서열로 구성된 분리되어 있는 핵산을 포함한다. 상기 위탁은 부다페스트 조약하의 특허 절차 및 조항(regulation)의 목적을 위해 미생물 위탁 국제 승인(the International Recognition of the Deposit of Microorganisms)에서의 부다페스트 조약(Budapest Treaty) 규정(provision)하에 이루어졌다.
- [0202] 추가의 기술없이, 상기 기술된 것과 하기의 실시예를 이용하여, 당업계의 평이한 기술(ordinary skill) 중 하나는 본 발명의 물질(agent)을 만들고 이용할 수 있으며 청구하는 방법을 실행할 수 있다. 하기의 실시예는 본 발명의 실행을 가능하게 하기위해 제공되는 것이며, 본 발명의 나머지를 어떠한 방법으로도 제한하지 않는다.

실시예 1

- [0203] 인간 CD19에 대한 쥐 단일클론 FMC63 항체(mouse monoclonal FMC63 antibody)의 인간화(humanization)
- [0204] 여기에서, 인간 CDR 이식된 수용체 구조(human CDR-grafted acceptor frameworks)의 결합 특성(binding properties)을 상당히 보유하고 및/또는 개선시키는 인간 수용체 구조(human acceptor frameworks), 복귀 돌연변이(back mutations), 및 돌연변이(mutations)를 포함하는 항-인간 CD19 쥐 항체 FMC63(anti-human CD19 murine antibody FMC63)의 인간화를 기술한다.
- [0205] FMC63은 인간 전림프구독소 백혈병 세포주(human prolymphocytic leukaemia cell line) JVM3(Zola H. et al (1991), Immunol Cell Biol., 69:411-22.)으로 면역화시킨 쥐로부터 분리되고, 가면 부위가 알려지고 공개적으로 이용가능한[중쇄(Heavy chain) NCBI 어세션 넘버(accession number), CAA74659 (서열 번호: 1); 경쇄(Light chain) NCBI 어세션 넘버, CAA74660 (서열 번호: 2)] 쥐(murine) IgG, 카파(kappa) 항체이다. 항원-결합 친화력(antigen-binding affinity)을 검사하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고 반-최대 결합 검사법(half-maximal binding assays), 경쟁 검사법(competition assays), 및 스캐차드 플랏 분석(Scatchard plot analysis)을 포함한다.
- [0206] **재형성된 모양의(reshaped) 가변 부위(variable regions)의 설계**
- [0207] 인간 수용체 구조의 선택: 상동성 매치(homology matching)는 FMC63 CDRs에 이식되는 인간 수용체 구조(human acceptor frameworks)를 선택하기 위하여 사용된다. 데이터베이스(예를 들면 인간 및 쥐의 면역 글로불린 위치(loci)로부터의 배선 가변 유전자(germline variable gene)의 데이터베이스 VBASE2 (Retter I. et al, 2005, Nucleic Acids Res., 33, Database issue D671-D674), 또는 카바트(Kabat) 데이터베이스(Johnson G. et al, 2000, Nucleic Acids Res., 28, p214-218)] 또는 공개(예를 들면, Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1992)는 쥐의 중쇄 및 경쇄 V 부위가 속하는 인간 아계열(subfamily)을 밝히고 수용체 분자로 사용하기에 가장 잘 맞는 인간 배선 구조(human germline framework)를 결정하는데 사용될 수 있다. 수용체 분자로 사용되는 상기 아계열안에서 VH 및 VL 서열의 선택은 이식(grafting)후 적절한 상대적 6개의 CDR의 보여지는 것(presentation)을 유지하는 것을 돕기 위해 서열 상동성(sequence homology) 및/또는 CDR1 및 CDR2 부위 구조(structure)의 매치(match)에 기초한다.
- [0208] 예를 들면, VBASE2 데이터베이스의 사용은 FMC63의 카파(kappa) 경쇄 FMC63 VL 구조 및 인간 카파 아계열 I의 멤버사이에서 상동성이 좋은 것으로 카파 한 아계열인 것을 가르킨다. CDR 및 구조 서열 모두의 가장 높은 상동성(homology) 및 유사성(identity)은 4개의 배선 서열에서 관찰된다: IGKV1-5*03(VBASE2 ID humIGKV087) (서열 번호: 3), IGKV1-27*01(VBASE2 ID humIGKV106) (서열 번호: 4), IGKV1-39*01(VBASE2 ID humIGKV115) (서열

번호: 5), 및 IGKV1-12*01(VBASE2 ID humIGKV094) (서열 번호: 6); 이들은 CDR3까지 모든 서열에 대해 각각 70.4%, 75%, 76.1%, 및 72.7%의 서열 유사성(sequence identity)를 갖고, 구조 부위에 대해 각각 74.3%, 78.6%, 78.6%, 및 77.1%의 서열 유사성을 갖는다. 완전한 LCD3 및 구조 4 부위가 VBASE2에 포함되지 않기 때문에, 인간 수용체 구조에 대해 가장 매칭이 좋은 JK 부분 서열(segment sequence)은 건강한 공여체(donor) B 세포 mRNA로부터 준비된 상보적 DNA(complementary DNA; cDNA)의 분석에 의해 동정되고, 이것은 표 1에서 보여 지듯이 디제너레이트 프라이머(degenerate primer) 및 카파 아형으로부터의 면역 글로불린 경쇄 첫번째 불변 도메인을 이용하여 증폭된다. 이러한 방법을 사용하여 증폭으로부터 가장 매치가 좋은 서열은: 각각 IGKV1-5*03(서열 번호: 3), IGKV1-27*01 (서열 번호: 4), IGKV1-39*01 (서열 번호: 5), 및 IGKV1-12*01(서열 번호: 6)에 대해 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 및 서열 번호: 10이다.

표 1

정방향 프라이머 서열(5'→3') (forward primer sequence)	역방향 프라이머 서열(5'→3') (reverse primer sequence)
GATCGGATCCACTGGTGATATTGTGATGACYCAGWCTCC (서열 번호: 70)	GATCGGGCCGCACACTCTCCCTGTTGAAGCTCTT (서열 번호: 71)
배선 가변 부위 (germline variable region)	증폭된 가변 부위 (amplified variable region)
um IGKV 087 (서열 번호: 3)	AE18 VL-2a clone#39 (서열 번호: 7)
um IGKV 106 (서열 번호: 4)	AE18 VL-2a clone#40 (서열 번호: 8)
um IGKV 115 (서열 번호: 5)	AE18 VL-2a clone#43 (서열 번호: 9)
um IGKV 094 (서열 번호: 6)	AE18 VL-2a clone#44 (서열 번호: 10)

유사하게, VBASE2의 사용은 구조 3개에 대한 FMC63의 VH 서열이 인간 VH 아계열 III에 맞다는 것을 가르킨다. 인간 VH 아계열 III내에서, FMC63은 IGHV3-33*01(VBASE2-ID: humIGHV199) (서열 번호: 11), IGHV3-11*01(VBASE2-ID: humIGHV175) (서열 번호: 12), IGHV3-30*18(VBASE2-ID: humIGHV195) (서열 번호: 13), 및 IGHV3-48*01(VBASE2-ID: humIGHV031) (서열 번호: 14)와 가장 높은 상동성을 갖는 서열을 나타내고, 이것은 구조 및 CDR 부위에 대해 70.4% 이상의 서열 상동성을 나타낸다. 경쇄에 있어서, 상호 양립되는 JH 부분(segment)를 동정하기 위한 자료(source)는 건강한 공여체 B 세포 mRNA로부터 준비되고, 디제너레이트 프라이머(degenerate primer) 및 IgM 중쇄 첫번째 불변 도메인(표 2)와 함께 증폭된 cDNA이다. 하기의 서열: 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 18는 각각 IGHV3-33*01(VBASE2-ID: humIGHV199) (서열 번호: 11), IGHV3-11*01(VBASE2-ID: humIGHV175) (서열 번호: 12), IGHV3-30*03(VBASE2-ID: humIGHV195) (서열 번호: 13), 및 IGHV3-48*01(VBASE2-ID: humIGHV031) (서열 번호: 14)에 가장 가까웠다.

표 2

정방향 프라이머 서열(5'→3') (forward primer sequence)		역방향 프라이머 서열(5'→3') (reverse primer sequence)	
GATCGGATCCACTGGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (서열 번호: 72)		GATCGCGGCCGCTGGAAGAGGCACGTTCTTTCTTT (서열 번호: 73)	
GATCGGATCCACTGGTCAGGTTCAGCTKGTGCAGTCTGG (서열 번호: 113)			
배선 가변 부위 (germline variable region)	프라이머 (primer)	증폭된 가변 부위 (amplified variable region)	
Hum IGHV 199 (서열 번호: 11)	서열 번호: 72 서열 번호: 73	pAE18 VH-3a clone#2 (서열 번호: 15)	

Hum IGHV 175 (서열 번호: 12)	서열 번호: 72 서열 번호: 73	pAE18 VH-3a clone#5 (서열 번호: 16)
Hum IGHV 195 (서열 번호: 13)	서열 번호: 113 서열 번호: 73	pAE18 VH-1b clone#16 (서열 번호: 17)
Hum IGHV 031 (서열 번호: 14)	서열 번호: 113 서열 번호: 73	pAE18 VH-1b clone#20 (서열 번호: 18)

[0212] 초기 CDR 이식된 인간 가변 부위(initial CDR grafted human variable regions) 제작

[0213] 상기 제조된 인간 VH 및 VL 단편을 인간화 하는 과정을 시작하기 위해 사용한다. 겹쳐진 PCR(overlap PCR)을 사용한 CDR 이식(grafting)에 대한 cDNA는 하기 중쇄 및 경쇄에 기초하여 첫번째 인간화된 후보를 제공하기 위해 주형(template)으로서 사용된다: VH2(서열 번호: 19), VH5(서열 번호: 20), VH16(서열 번호: 21), VH20(서열 번호: 22), VL39(서열 번호: 23), VL40(서열 번호: 24), VL43(서열 번호: 25), 및 VL44(서열 번호: 26), 이것은 본 CDR(original CDR)이 표 3에서 보여지는 것과 같이 FMC63 CDR로 대체된 것이다.

표 3

[0214] FMC63 CDR 부위.

	중쇄(heavy chain)		경쇄(light chain)	
	아미노산 서열	서열 번호:	아미노산 서열	서열 번호:
CDR1	GVSLPDYGV	27	RASQDISKYL	30
CDR2	VIWGSETTYNSALKS	28	HTSRLHS	31
CDR3	HYYYGGSYAMDY	29	QQGNTLPYT	32

[0215] VH2, VH5, VH16 및 VH20 중쇄는 표 4 및 5에 기술된 것과 같은 4-단편 조립(4-fragment assembly) PCR 전략을 사용하여 FMC63 CDR과 교환된 CDR과 함께, 각각 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 18를 암호화하는 cDNA에 기초한다. 표 6 및 7에서 보이는 것과 같은 유사한 전력이 VL39, VL40, VL43, 및 VL44에도 사용된다. 중쇄에 있어서, 표 4에 기술된 PCR-증폭의 생산물은 가변 도메인 cDNA(하기 참조)의 3' 말단에 SalI 부위를 첨가하기 위해 어답터 프라이머(adaptor primer) [센스 프라이머, HindIII VJ2C(서열 번호: 93); 및 안티-센스 프라이머, SalI 어답터(서열 번호: 92)]를 사용하여 2차 PCR을 수행함으로써 서브클론(subclone)된다. 표 6에 기술된 증폭은 카파 사슬(chain) 클로닝을 포유류 세포 발현 벡터(하기에 기술)로 도입시킨다. 상기 예에서, 생산물은 가변뿐 아니라 전장(full-length)의 불변 카파 도메인을 포함하고 BamHI 및 NotI 부위 전략을 사용하여 포유류 세포 발현 벡터에 클론된다.

표 4

[0216] 첫 번째 CDR-이식 중쇄 가변 부위(CDR-grafted heavy chain variable region)를 만들기 위해 사용된 주형(template) 및 프라이머의 요약.

구성체 (Construct)	주형 (template)	단편 1 (fragment 1) PCR 프라이머	단편 2 (fragment 2) PCR 프라이머	단편 3 (fragment 3) PCR 프라이머	단편 4 (fragment 4) PCR 프라이머
--------------------	------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

이식된 (grafted) VH2/FMC63 (서열 번호: 19)	pAE18 VH-3a clone#2 (서열 번호: 15)	CMV-IE 정방향 (서열 번호: 74) 및 VH2 mCDR1 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 76)	VH2 mCDR1 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 77) 및 VH2 mCDR2 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 78)	VH2 mCDR2 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 79) 및 VH2 mCDR3 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 80)	VH2 mCDR3 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 81) 및 BGH 역방향 (서열 번호: 75)
이식된 (grafted) VH5/FMC63 (서열 번호: 20)	pAE18 VH-3a clone#5 (서열 번호: 16)	CMV-IE 정방향 (서열 번호: 74) 및 VH5 mCDR1 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 82)	VH5 mCDR1 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 83) 및 VH20 mCDR2 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 89)	VH5 mCDR2 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 84) 및 VH5 mCDR3 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 85)	VH5 mCDR3 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 86) 및 BGH 역방향 (서열 번호: 75)
이식된 (grafted) VH16/FMC63 (서열 번호: 21)	pAE18 VH-1b clone#16 (서열 번호: 17)	CMV-IE 정방향 (서열 번호: 74) 및 VH5 mCDR1 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 82)	VH2 mCDR1 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 77) 및 VH2 mCDR2 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 78)	VH2 mCDR2 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 79) 및 VH16 mCDR3 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 87)	VH2 mCDR3 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 81) 및 BGH 역방향 (서열 번호: 75)
이식된 (grafted) VH20/FMC63 (서열 번호: 22)	pAE18 VH-1b clone#20 (서열 번호: 18)	CMV-IE 정방향 (서열 번호: 74) 및 VH20 mCDR1 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 88)	VH2 mCDR1 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 77) 및 VH20 mCDR2 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 89)	VH20 mCDR2 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 90) 및 VH20 mCDR3 링커(linker) 역 방향 (서열 번호: 91)	VH2 mCDR3 링커(linker) 정 방향 (서열 번호: 81) 및 BGH 역방향 (서열 번호: 75)

표 5

선택된 인간 중쇄의 첫 번째 CDR-이식 가변 부위를 제작하기 위해 사용된 프라이머 서열.

프라이머(primer)	5'→3'
CMV-IE 정방향 (서열 번호: 74)	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG

BGH 역방향 (서열 번호: 75)	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
VH2 mCDR1 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 76)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA CGC TGC ACA GGA GAG TCT C
VH2 mCDR1 링커(linker) 정방향 (서열 번호: 77)	GGC GTG AGC CTG CCC GAC TAC GGC GTG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GG
VH2 mCDR2 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 78)	GGC GCT GTT GTA GTA GGT TGT CTC GGA GCC CCA GAT CAC TGC CAC CCA CTC CAG CCC CTT G
VH2 mCDR2 링커(linker) 정방향 (서열 번호: 79)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC
VH2 mCDR3 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 80)	CAT GGC CTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TGT GGT ACA GTA ATA CAC GGC
VH2 mCDR3 링커(linker) 정방향 (서열 번호: 81)	CAC TAC TAC TAC GGC GGC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
VH5 mCDR1 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 82)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA GGC TGC ACA GGA GAG TCT C
VH5 mCDR1 링커(linker) 정방향 (서열 번호: 83)	GGC GTG AGC CTG CCC GAC TAC GGC GTG AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG
VH5 mCDR2 링커(linker) 정방향 (서열 번호: 84)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC
VH5 mCDR3 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 85)	GTA GTC CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG CCC CGC ACA GTA ATA AAC GGC
VH5 mCDR3 링커(linker) 정방향 (서열 번호: 86)	CAC TAC TAC TAC GGC GGC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC
VH16 mCDR3 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 87)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TCT CGC ACA GTA ATA CAC GGC
VH20 mCDR1 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 88)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA GGC TAC ACA GGA GAG TCT C
VH20 mCDR2 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 89)	GGC GCT GTT GTA GTA GGT TGT CTC GGA GCC CCA GAT CAC TGA AAC CCA CTC CAG CCC CTT C
VH20 mCDR2 링커(linker) 정방향 (서열 번호: 90)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
VH20 mCDR3 링커(linker) 역방향 (서열 번호: 91)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TCT CGC ACA GTA ATA CAC AGC
SalI 어답터(adaptor) (서열 번호: 92)	GATC GTCGAC GC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GG

HindIII VJ2C 정방향 (서열 번호: 93)	GATCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACTC
------------------------------------	-------------------------------------

표 6

[0218] 첫 번째 CDR-이식 경쇄 부위(1st CDR-grafted light chain variable regions)를 만들기 위해 사용된 주형 및 프라이머의 요약.

Construct	주형 (template)	단편 1 (fragment 1) PCR 프라이머	단편 2 (fragment 2) PCR 프라이머	단편 3 (fragment 3) PCR 프라이머	단편 4 (fragment 4) PCR 프라이머
이식된 (grafted) VL39/FMC63 (서열 번호: 23)	pAE18 VL-2a clone#39 (서열 번호: 7)	CMV-IE (서열 번호: 74) 및 VL43 mCDR1 링커 역방향 (linker Reverse (서열 번호: 101)	VL43 mCDR1 링커 정방향 (서열 번호: 102) 및 VL43 mCDR2 링커 역방향 (서열 번호: 103)	VL39 mCDR2 링커 정방향 (서열 번호: 94) 및 VL39 mCDR3 링커 역방향 (서열 번호: 95)	VL39 mCDR3 링커 정방향 (서열 번호: 96) 및 NotI Kappa 역방향 (서열 번호: 112)
이식된 VL40/FMC63 (서열 번호: 24)	pAE18 VL-2a clone#40 (서열 번호: 8)	CMV-IE (서열 번호: 74) 및 VL43 mCDR1 링커 역방향 (서열 번호: 101)	VL43 mCDR1 링커 정방향 (서열 번호: 102) 및 VL40 mCDR2 링커 역방향 (서열 번호: 97)	VL40 mCDR2 링커 정방향 (서열 번호: 98) 및 VL40 mCDR3 링커 역방향 (서열 번호: 99)	VL40 mCDR3 링커 정방향 (서열 번호: 100) 및 NotI Kappa 역방향 (서열 번호: 112)
이식된 VL43/FMC63 (서열 번호: 25)	pAE18 VL-2a clone#43 (서열 번호: 9)	CMV-IE (서열 번호: 74) 및 VL43 mCDR1 링커 역방향 (서열 번호: 101)	VL43 mCDR1 링커 정방향 (서열 번호: 102) 및 VL43 mCDR2 링커 역방향 (서열 번호: 103)	VL43 mCDR2 링커 정방향 (서열 번호: 104) 및 VL43 mCDR3 링커 역방향 (서열 번호: 105)	VL43 mCDR3 링커 정방향 (서열 번호: 106) 및 NotI Kappa 역방향 (서열 번호: 112)

이식된 VL44/FMC63 (서열 번호: 26)	pAE18 VL-2a clone#44 (서열 번호: 10)	CMV-IE (서열 번호: 74) 및 VL44 mCDR1 링커 역방향 (서열 번호: 107)	VL43 mCDR1 링커 정방향 (서열 번호: 102) 및 VL44 mCDR2 링커 역방향 (서열 번호: 108)	VL44 mCDR2 링커 정방향 (서열 번호: 109) 및 VL44 mCDR3 링커 역방향 (서열 번호: 110)	VL44 mCDR3 링커 정방향 (서열 번호: 111) 및 NotI Kappa 역방향 (서열 번호: 112)
--------------------------------------	--	--	---	---	--

표 7

[0219]

선택된 인간 경쇄의 첫 번째 CDR-이식 가변 부위를 만들기 위해 사용된 프라이머 서열.

프라이머(Primer)	5'→3'
VL39 mCDR2 링커(linker) 정방향(Forward) (SEQ ID NO: 94)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC
VL39 mCDR3 링커 역방향(Reverse) (SEQ ID NO: 95)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG GCA GTA ATA AGT TGC AAA ATC ATC
VL39 mCDR3 링커 정방향 (SEQ ID NO: 96)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG G
VL40 mCDR2 링커 역방향 (SEQ ID NO: 97)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG GTT AGG AAC
VL40 mCDR2 링커 정방향 (SEQ ID NO: 98)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCT CGG TTC AGC GGC
VL40 mCDR3 링커 역방향 (SEQ ID NO: 99)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA GTA ATA AGT TGC AAA ATC TTC
VL40 mCDR3 링커 정방향 (SEQ ID NO: 100)	CAG CAA GGC AAC ACA GTC CCC TAC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
VL43 mCDR1 링커 역방향 (SEQ ID NO: 101)	GTT CAG GTA CTT GCT GAT GTC CTG GCT GGC CCG GCA AGT GAT GGT GAC TCT GTC TCC
VL43 mCDR1 링커 정방향 (SEQ ID NO: 102)	CGG GCC AGC CAG GAC ATC AGC AAG TAC GTG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG
VL43 mCDR2 링커 역방향 (SEQ ID NO: 103)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG CTT AGG GGC
VL43 mCDR2 링커 정방향 (SEQ ID NO: 104)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC
VL43 mCDR3 링커 역방향 (SEQ ID NO: 105)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA GTA GTA AGT TGC AAA ATC TTC

VL43 mCDR3 링커 정방향 (SEQ ID NO: 106)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG G
VL44 mCDR1 링커 역방향 (SEQ ID NO: 107)	GTT CAG GTA CTT GCT GAT GTC CTG ACT GGC CCG ACA AGT GAT GGT GAC TCT GTC TCC
VL44 mCDR2 링커 역방향 (SEQ ID NO: 108)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG AGA GAT CAG GAG GTT AGG GGC
VL44 mCDR2 링커 정방향 (SEQ ID NO: 109)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC
VL44 mCDR3 링커 역방향 (SEQ ID NO: 110)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA ATA ATA AGT TGC AAA ATC TTC
VL44 mCDR3 링커 정방향 (SEQ ID NO: 111)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTT GGC CAG GGG ACC AAG TTG G
NotI 카파(Kappa) 역방향Reverse (SEQ ID NO: 112)	GATC GCGGCCGC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC

[0220] 조작된 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 DNA 서열은 CMV 프로모터(promoter) 및 소 성장 호르몬 다중-아데닐화 신호(Bovine Growth Hormone poly-adenylation signal)를 갖는 변형된 pREP4(Invitrogen, CA, USA) 벡터를 기본으로 한 독립적 벡터에서 연결(ligation)된다. 경쇄 특이적 벡터는 BamHI 및 BsiWI 제한 부위(restriction sites)를 사용하여 카파 경쇄 불변 도메인 cDNA 단편 앞에 가변 카파 경쇄 cDNA 단편을 연결시킴으로써 카파 아형(Kappa isotype) 경쇄를 발현시킨다; 반면에 중쇄 특이적 벡터는 BamHI 및 SalI 제한 부위를 사용하여 가변 중쇄 cDNA 단편이 γ 1, 연결부위(hinge), γ 2, 및 γ 3 불변 도메인을 암호화하는 cDNA 앞에 연결되도록 조작된다. 중쇄 및 경쇄 발현 벡터 모두에서, 분비(secretion)는 BamHI 위치(site)를 포함하는 쥐 VJ2C 선도 펩티드(leader peptide)에 의해 유도된다. BsiWI 위치는 카파 불변 도메인에 위치한다; 반면에 SalI의 위치는 C γ 1 도메인에 위치한다.

[0221] 면역 글로불린 후보의 일시적인 발현을 위해, 동량의 중쇄 및 경쇄 벡터는 서스펜션-적응된(adapted) HEK-EBNA 세포(ATCC-CRL-10852)에 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine; PEI)을 사용하여 함께 형질도입(co-transfection)된다. 일반적으로, 0.8-1.2 10^6 (million) 세포/ml 밀도의 서스펜션(suspension) 되어있는 세포 100ml에 중쇄를 암호화하는 발현 벡터 50 μ g 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터 50 μ g를 함유하는 DNA-PEI 혼합물을 형질도입시킨다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 숙주 세포에 도입되었을 때, 배지(EX-CELL 293, HEK293-serum-free medium, Sigma, Buchs, Switzerland) [0.1% 플루오닉 산(pluronic acid), 4mM 글루타민(glutamine), 및 0.25 μ g/ml 제네티신(geneticin)이 첨가된 배지]로 분비시키기 위해 항체는 세포가 형질 도입 후 4 내지 5일의 기간 동안 배양됨으로써 생성된다. 그 후, 재조합 단백질-A 흐르는 배양액(streamline media)를 사용하여 세포가 없는 상층액(cell-free supernatant)으로부터 항체를 정제하고, 검사(assay) 전에 인산완충액(phosphate buffer saline)으로 교환하여 완충화한다.

[0222] 인간화 전략은 처음 4개의 이식된 중쇄 및 경쇄(상기)에 기초하는 것으로, 이는 16개의 초기 전장(full-length)의 면역 글로불린 후보를 유도하기 위해 쌍의(pair-wise) 방법으로 혼합된다. 상기 면역 글로불린을 B 세포 림프종 세포주에서 반-최대 결합 검사법(half-maximal binding assays) (FACS)에 의해 항체-결합 친화력 검사하고 FMC63의 키메라 형태[실시예 2에서 기술된 것과 같이, 이것은 항 인간 Fc PE가 표지된 탐지 항체(anti-human Fc PE-labeled detection-antibody)로부터의 염색 정도 표준화를 위한 것이다]에 비교한다. 상기 초기 실험으로부터, VH16(서열 번호: 21) 또는 VH20(서열 번호: 22)를 포함하는 면역 글로불린 후보는 도 1의 A 및 도 1의 B에서 보여지는 것과 같이, FACS 실험에서 라지 세포(Raji cell)에 가장 좋은 결합을 보였다. 표 8

에 보여지는 것과 같이 경쇄 VL43와 짝을 이루는 VH16 중쇄로 구성된 상기 항체는 일시적인 형질도입에서 우수한 발현 정도(level) 뿐만 아니라 그것의 FAB 단편의 우수한 녹는점(melting temperature; T_m)을 갖고 결과적으로 나아가 복귀 돌연변이(back-mutation) 및 합리적 조작을 위해 선별된다.

표 8

[0223] 1차 CDR-이식 항체의 IgG 일시적 발현 정도 및 FAB 안정성(stability).

항체(antibody)	발현(mg/L)	T _m Fab(℃)
키메라 FMC63(chimeric FMC63)	48	84.27
VH2/VL39	11	78.78
VH2/VL40	23	76.55
VH2/VL43	13	73.17
VH2/VL44	21	78.27
VH5/VL39	5	76.08
VH5/VL40	9	ND
VH5/VL43	19	76.76
VH5/VL44	12	74.81
VH16/VL39	8	71.67
VH16/VL40	11	71.81
VH16/VL43	20	83.54
VH16/VL44	7	85.16
VH20/VL39	11	82.41
VH20/VL40	24	79.46
VH20/VL43	37	79.67
VH20/VL44	26	82.00

[0224] 인간 구조(human framework)의 복귀 돌연변이(back mutations)

[0225] FMC63 쥐 항체로부터 CDR의 직접적 이식(straight grafting)은 낮은 결합력을 가진 인간 수용체를 초래하기 때문에, 구조에 있는 특정 잔기(residue)를 어느 위치에서 쥐의 잔기로 복귀 돌연변이 시키는 것이 바람직하다. 복귀 돌연변이(back-mutation)이라고 불리는 상기 과정은 단일클론 항체의 인간화에서 가장 예측불허한 과정이고, 모항체의 결합력을 상당히 보유하는 것과 동시에 결과적으로 생긴 항체의 면역원성(immunogenicity)을 최소화시키기 위해 보유될 필요가 있는 모항체(parent antibody)의 중요한 구조 잔기를 동정(identification)하는 것을 필요로 한다. 표 9 및 10 및 도 2의 A 및 도 2의 B는 CDR의 형태(conformation)에 영향을 미칠 수 있고 쥐의 잔기로 복귀 돌연변이에 대해 가능성 있는 후보로 선택된 잔기(카바트 넘버링)를 보여준다.

[0226]

표 9

[0227] FMC63 및 인간 수용체 경쇄 구조(human acceptor light chain framework)와의 비교.

카바트 위치 (Kabat position)	VH		
	FMC63	VH16	VH20
37	I	V	V
42	R	G	G
48	L	V	V
49	G	A	S
67	L	F	F
71	K	R	R
78	V	L	L
94	K	R	R

표 10

[0228] FMC63 및 인간 수용체 중쇄 구조(human acceptor heavy chain framework)와의 비교.

카바트 위치 (Kabat position)	VL	
	FMC63	VL39, VL40, VL43, VL44
44	V	P, P, P, P
71	Y	F, F, F, F
87	F	Y, Y, Y, Y

[0229] 중쇄에 대한 8개의 가능한 복귀 돌연변이 중에서, 위치 37, 48, 및 49에서의 변화는 그들의 보존적 특성 (conservative nature) 때문에 버려진다. 따라서 VH16의 다시 형성된 4개의 형태가 만들어졌고, 쌍의(pair-wise) 방법으로 VL43의 3개의 모든 복귀 돌연변이와 혼합된다. 다시 형성된 변이들은 각각의 복귀 돌연변이의 영향을 조사하기 위해 모의(parental) VH16 및 VH43과 쌍을 이루었다. 전체 24개의 전장(full-length) 면역 글로불린 후보가 조사되었다. 5개의 중쇄 변이는 VH16 서열과 비교하여 하기의 점 돌연변이(single point mutation)를 가진다: G42R, F67L, R71K, L78V, 및 R94K; 반면에, 4개의 경쇄 변이는 VL43과 비교하여 P44V, F71Y, 및 Y87F를 가진다. FACS 실험으로부터(실시예 2에 기술되어 있는), 일시적 발현 정도 및 FAB 안정성 측정은 표 11 및 12에서 보여지듯이 복귀 돌연변이 중쇄 R94K 및/또는 경쇄 P44V가 좋은 FAB 안정성을 유지하고 발현 정도는 개선시킴과 동시에 극적으로 라지 세포 또는 NALM-6 세포에 대한 결합을 증가시켰다는 것을 보인다. 상기 2개의 위치만으로는 모 FMC63 항체의 결합의 반(half) 정도를 회복시킨다.

표 11

[0230] 라지(Raji) 및 NALM-6 종양 세포주(tumour cell-line)에서 인간화된 복귀 돌연변이 항-CD19 항체의 FACS 염색. 값(각각 라지 및 NALM-6 세포로 명시된 라지 및 NALM-6 세포에서의 측정값)은 세포 유동 분석(flow-cytometry)에 의해서 측정되어 FMC63 키메라 항체에서 관찰된 것에 대한 퍼센트(percentage)로 나타내어진 항체 중간-값 형광도(mid-point fluorescence; MPF) 측정값에 상응한다.

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

표 12

[0231] 인간화된 복귀 돌연변이 항-CD19 항체의 IgG 일시적 발현 정도 및 FAB 안정성.

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

[0232] 배선(Germlining)

[0233] 체성 돌연변이(somatic mutation)의 결여가 면역원성(immunogenicity) 정도를 낮출 수 있기 때문에, 일반적으로 인간화된 항체에 대한 수용체 구조로서 배선 구조(germline framework)는 각각의 성숙 항체 구조(mature antibody framework)보다 좋다. VH16은 VBASE2로부터의 배선 서열에 따라 고안된 디제너레이트 프라이머(degenerate primer)를 사용하여 건강한 공여체 B 세포 mRNA로부터 유래되었고, 상기 과정은 어떠한 항원도 아직 만나지 않은 항체를 제공한다. 하지만, 진정으로 미성숙한(naive) 항체의 빈도는 매우 B 세포의 출처(source)에 의존하기 때문에, 돌연변이는 상기 과정에서 관찰될 수 있다(Klein U. et al, 1997, Blood 89, p1288-1298). VH16 및 VH43 모두는 배선으로 복귀 돌연변이 된 낮은 함량의 비배선(non-germline) 잔기를 가지며, 상기 변화는 표 13에서 보여지듯이 VH16-Q6E, VL43-V3Q, 및 VL43-T7S이다.

표 13

[0234] 라지(Raji) 종양 세포주(tumour cell-line)에서 인간화된 복귀 돌연변이/배선의(germlined) 항-CD19 항체의 FACS 염색. 값(라지로 명시된)은 세포 유동 분석(flow-cytometry)에 의해서 측정되어 FMC63 키메라 항체에서 관찰된 것에 대한 퍼센트(percentage)로 나타내어진 항체 중간-값 형광도(mid-point fluorescence; MPF) 측정 값이다. 인간화된 복귀 돌연변이/배선 항-CD19 항체의 IgG 일시적 발현 정도 및 FAB 안정성 또한 명시되었다.

	VL43			VL43-V3Q/T7S		
	라지(Raji)	일시적 발현 정도 (mg/L)	FAB Tm (℃)	라지(Raji)	일시적 발현 정도 (mg/L)	FAB Tm (℃)
VH16	7.14	20	83.54	4.93	28	83.51
VH16-R94K	26.79	60	82.75	27.78	13.5	82.36
VH16-Q6E	ND	30	83.12	5.68	36	83.46

[0235] 모든 배선 변화는 친화력 또는 FAB 안정성 모두에 대하여 VH16-VL43 항체에서 영향이 없는 것으로 보여지고 단지 일시적 발현 정도만 상승 되었다. 그 후, 위치 VL43-V3Q 및 VL43-T7S에서 배선 잔기의 VH16-VL43 변이는 합리적 고안(하기)을 통하여 친화력 개선을 위해 사용되었다.

[0236] 합리적 고안(rational design) 및 CDR 조작(CDR engineering)에 의한 복귀 돌연변이된 인간 수용체의 친화력 개선

[0237] 티로신 돌연변이(Tyrosine mutants) FMC63 CDR은 높은 함량의 티로신을 갖는다: 중쇄 CDR1(위치 32), 중쇄 CDR2(위치 58 및 59), 중쇄 CDR3(위치 96, 97, 98 및 100b), 경쇄 CDR1(위치 32), 및 경쇄 CDR3(위치 96). 특별한 것은 중쇄 CDR3에서 4개의 티로신 잔기(Y96, Y97, Y98, 및 Y100b)에서 발견되고, 다른 2개의 티로신 잔기는 중쇄 CDR1 및 경쇄 CDR1 모두의 위치 32에서 발견된다. 상기 잔기들은 그들의 소수성 특성 및 잔기 대부분은 대개 그 특이성(specificity)을 결정하는 가장 중요한 CDR인 중쇄 CDR3의 부분이라는 사실뿐 아니라 그들은 VH16-R94K/VL43 3D-모델(model)에서 항체 결합 부위 면(antibody binding-site plan)의 밖으로 뚜렷하게 돌출되었기(protrude) 때문에, 추정상의(putative) 인간 CD19 분자와의 상호 결합 부위로 정의될 수 있다. 종합된 상기 관찰들은 중쇄 CDR3 잔기 96, 97, 98, 100b 및 경쇄 CDR1 잔기 32를 합리적인 친화력 개선을 위한 후보로서 동정하게 한다. 티로신 잔기는 그들의 아로마틱 링(aromatic ring) 및 하이드록시기(hydroxy group)에 의해 각각 소수성 및 극성의 이중성을 갖기 때문에 유일하다. 따라서, 상기 잔기들은 소수성을 증가시키고 극성에 비해(versus) 소수성 함량의 중요성을 탐지하기 위해 상기 위치에서 페닐알라닌(phenylalanine)으로 돌연변이화되었다. 표 14에서 보여지듯이 키메라 FMC63 친화력의 72.8%를 갖는 중쇄 돌연변이 Y97F와 함께, 중쇄 R94K 돌연변이에서의 페닐알라닌 돌연변이 측정은 중쇄 돌연변이 32, 97, 98 뿐만 아니라 경쇄 돌연변이 32가 모 분자 VH16-R94K/VL43보다 우월하다는 것을 보였다.

표 14

[0238]

라지(Raji) 종양 세포주(tumour cell-line)에서 인간화된 복귀 돌연변이/친화력 성숙 항-CD19 항체의 FACS 염색. 값(라지로 명시된)은 세포 유동 분석(flow-cytometry)에 의해서 측정되어 FMC63 키메라 항체에서 관찰된 것에 대한 퍼센트(percentage)로 나타내어진 항체 중간-값 형광도(mid-point fluorescence; MPF) 측정값이다. 인간화된 복귀 돌연변이/친화력 성숙 항-CD19 항체의 일시적 IgG 발현 정도 및 FAB 안정성 또한 명시되었다.

항체	상대적 라지 FACS 염색	일시적 발현 정도 (mg/l)	FAB T _m (°C)
VH16 R94K Y32F VL43	62.5	17	82.51
VH16 R94K Y96F VL43	5.36	14	83.53
VH16 R94K Y97F VL43	72.82	17	81.53
VH16 R94K Y98F VL43	34.09	10	81.91
VH16 R94K Y100bF VL43	27.78	24	82.92
VH16 R94K VL43 Y32F	39.47	25	82.56

[0239]

경쇄-프로 44 돌연변이(Light chain-Pro 44 mutants) 경쇄 P44는 발린(valine)으로 복귀 돌연변이 되었을 때 친화력의 매우 큰 개선을 설명할 수 있는 위치인 중쇄 및 경쇄 사이의 접점(interface)의 밑면(bottom)에 위치한다. 경쇄 및 중쇄 사이의 접점을 가능하게는 조정(또는 보다 낮게는 조절)하기 위해서 2개의 다른 소수성 아미노산은 위치 44에서 조사되었다: 표 15에서 보여지듯이 VH16-R94K 변이에서 이소루신(isoleucine) 및 루신(leucine) 변이가 제작되었다. 친화력 및 안정성 측정은 위치 44에서 이소루신이 발린 복귀 돌연변이보다 우월하다는 것을 보여주었고, 반면에 루신으로의 변화는 더 타당한 선택이었음에도 불구하고 단지 약간의 개선을 제공하였다.

표 15

[0240]

라지(Raji) 종양 세포주(tumour cell-line)에서 인간화된 복귀 돌연변이/친화력 성숙 항-CD19 항체의 FACS 염색. 값(라지로 명시된)은 세포 유동 분석(flow-cytometry)에 의해서 측정되어 FMC63 키메라 항체에서 관찰된 것에 대한 퍼센트(percentage)로 나타내어진 항체 중간-값 형광도(mid-point fluorescence; MPF) 측정값이다. 인간화된 복귀 돌연변이/친화력 성숙 항-CD19 항체의 일시적 IgG 발현 정도 및 FAB 안정성 또한 명시되었다.

항체	상대적 라지 FACS 염색	일시적 발현 정도 (mg/l)	FAB T _m (°C)
VH16 R94K VL43 P44I	69.44	17	81.37
VH16 R94K VL43 P44L	37.50	18	80.10

[0241]

가능성 있는 디아미데이션 부위(deamidation site)의 제거 디아미데이션은 항체 분해(degradation)의 주요한 경로이다. Asn이 Asp로 디아미데이션되는 것은 매우 서열-의존적이고 잘 알려진 또는 CDR 부위에서 유동성 있다고 예측되는 단백질 부분에서 일어난다(Bischoff and Kolbe (Journal of Chromatography B, 662 (1994), 261-278); 이것은 대개 CDR에 위치한 Asn 잔기와 관련이 있다. 아스파라긴(asparagine)의 디아미데이션에 대한 높은 가능성은 FMC63 경쇄 위치 91 내지 93 (GNT)의 CDR3에서 발견되었다. 따라서, 추정되는 디아미데이션을 막기 위하여, VH16-R94K 중쇄에서 하기의 변화를 조사하였다: 표 16에서 보여지는 것과 같은 VL43-N92A, VL43-T93V 및 VL-43-T93A. N92A 및 T93A 모두는 결합 친화력을 유지하는 것이 발견되었다. N92A 변이는 또한 개선된 FAB 안정성을 갖는 것이 발견되었다.

표 16

[0242]

라지(Raji) 종양 세포주(tumour cell-line)에서 인간화된 복귀 돌연변이/친화력 성숙/디아미데이션 부위 제거(deamidation stie removed) 항-CD19 항체의 FACS 염색. 값(라지로 명시된)은 세포 유동 분석(flow-cytometry)에 의해서 측정되어 FMC63 키메라 항체에서 관찰된 것에 대한 퍼센트(percentage)로 나타내어진 항체 중간-값 형광도(mid-point fluorescence; MPF) 측정값이다. 인간화된 복귀 돌연변이/친화력 성숙/디아미데이션 부위 제거 항-CD19 항체의 IgG 일시적 발현 정도 및 FAB 안정성 또한 명시되었다.

항체	상대적 라지 FACS 염색	일시적 발현 정도 (mg/l)	FAB T _m (°C)
VH16 VL43	7.14	20	83.54
VH16 R94K VL43	26.79	60	82.36
VH16 R94K VL43 N92A	25.86	33	84.09
VK16 R94K VL43 T93V	17.44	34	82.43
VH16 R94K VL43 T93A	34.09	35	82.81

[0243] VL43 인간 수용체의 다른 개선은 위치 F71에서 수행되었다. VH16 R94K VL43 F71H(서열 번호: 61), VH16 R94K VL43 F71S(서열 번호: 62), 및 VH16 R94K VL43 F71T(서열 번호: 63)의 라지 세포에 대한 결합 활성은 VH16 R94K VL43의 결합 활성과 유사하다.

[0244] **복귀 돌연변이 및 합리적으로 고안한(rationally-designed) 돌연변이의 결합**

[0245] 라지 세포에 대한 결합을 증가시키기 위해, 제한된 수의 조합을 검사하는 시스템 접근법(systematic approach)에서 복귀 돌연변이 및 합리적으로 고안한 돌연변이를 조합하였다. 중쇄 및 경쇄(상기)에서 티로신을 페닐알라닌으로 바꾸어 동정된 대부분의 개선된 돌연변이는 경쇄 변화 P44I, 및 N92A, 뿐만 아니라 배선 변화(germline changes) V3Q, 및 T7S와 결합되었다.

[0246] 비록 CDR 변화가 친화력 측면에서 종종 첨가적 효과(additive effect)를 갖지만, 그 CDR 변화가 구조, 복귀 및 CDR 돌연변이와 결합한 VH16/VL43 변이(variants)의 상대적인 FACS 염색을 보여준다. 중쇄 CDR 변화 Y32F, 및 Y97F의 복귀 돌연변이 R94K와 결합은 결합의 손실을 야기하는 반면, 중쇄 복귀 돌연변이 R94K 및 경쇄 변화 P44I 및 N92A와 Y32F 결합은 결합을 매우 개선 시키고, 이것은 우리의 측정 수단에 의해 FMC63 키메라보다 우월한 염색의 상대적인 중간-적정(mid-titration)을 초래한다. 또 다른 바람직한 결합은 중쇄 복귀 돌연변이 R94K에서 중쇄 CDR 돌연변이 Y100BF 및 Y32F, 및 경쇄 변화 V3Q, T7S, Y32F, P44I 및 N92A 모두이다.

표 17

[0247] 라지(Raji) 종양 세포주(tumour cell-line)에서 인간화된 복귀 돌연변이된/배선의/친화력 성숙된/디아미데이션 부위 제거된 항-CD19 항체의 FACS 염색. 값(라지로 명시된)은 세포 유동 분석(flow-cytometry)에 의해서 측정되어 FMC63 키메라 항체에서 관찰된 것에 대한 퍼센트(percentage)로 나타내어진 항체 중간-값 형광도(mid-point fluorescence; MPF) 측정값이다.

\ VL43	V3Q/T7S/ N92A	V3Q/T7S/ Y32F/N92A	V3Q/T7S/ P44I/N92A	V3Q/T7S/ Y32F/P44I/N92A
VH16 \				
R94K	18.18	낮은 포화도	83.33	111.11
Y32F/R94K	58.82	낮은 포화도	133.33	낮은 포화도
R94K/Y97F	낮은 포화도 (low saturation)	결합 없음 (No binding)	NA	낮은 포화도
R94K/Y100BF	NA	NA	101.01	144.93
Y32F/R94K/Y97F	16.95	결합 없음	낮은 포화도	6.67

[0248] 높은 결합 활성을 보이는 결합은 또한 높은 일시적 발현 정도(표 18) 뿐만 아니라 높은 FAB 단편 내열성(thermostability) (표19)를 갖는다.

[0249]

표 18

[0250] 인간화된 복귀 돌연변이된/배선의/친화력 성숙된/디아미데이션-부위-제거된 항-CD19 항체의 IgG 일시적 발현

정도.

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

표 19

[0251] 인간화된 복귀 돌연변이/배선/친화력 성숙/디아미테이션 부위 제거 항-CD19 항체의 FAB 안정도(℃).

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

실시예 2

[0252] B 세포-유도된 종양 세포주에 대한 CD19 항체의 결합: 세포 유동 분석(flow cytometry analysis)

[0253] 라지 종양 세포(human Burkitt lymphoma, DSMZ ACC319), NALM-6 (human B cell precursor leukemia, DSMZ ACC128) 및 SU-DHL-6(human B cell lymphoma, DSMZ ACC572) (DSMZ Braunschweig, Deutschland로부터 모든 세포주 구입)에 대한 CD19 인간화된 단일클론 항체의 결합이 세포 유동 분석에 의해 검사되었다. 세포는 각각 인간화된 단일클론 항체의 일련의 희석물(serial dilution)과 배양되었다. 관계없는 인간 IgG1은 음성 대조군으로서 사용되었다. 상기 세포들을 씻어주고 피코에리트린-표지된(phycoerythrin-labeled; PE) 항-인간 2차 항체(eBioscience, CA, USA)에 의해 탐지되었고 세포 유동 분석(flow cytometry)에 의해 분석되었다. 인간화된 후보 및 모 쥐의 항체 사이의 염색의 비슷한 정도를 확인하기 위해, 키메라 FMC63, 즉 서열 번호: 68에서 보여지듯이 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인과 연결된 FMC63 쥐의 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호: 69에서 보여지듯이 카과 불변 도메인과 연결된 쥐의 경쇄 가변 도메인으로 구성된 항체가 표준(standard)으로서 사용되었다. 라지 또는 NALM-6의 결합에 대한 결과는 표 11, 13-17에 나타내었고, SU-DHL-6세포주에 대한 결합은 도 3에 나타내었다. 도 3의 모든 결과는 염색한 세포의 평균 형광 강도(mean fluorescent intensity; MFI)를 측정한 것이다. MFI와 비교하여 항체 농도 곡선(antibody concentration curves), 각각의 항-CD19 인간화된 항체에 대한 중간값 형광도(Mid-Point Fluorescence; MPF) 값은 소프트웨어 그래프패드 프리즘 5(GraphPad Prism 5) (CA, US)을 사용하여 산출되었다. 농도 반응 곡선(dose response curve)의 MPF는 최대 염색의 50%가 관찰되었을 때의 항체의 농도($\mu\text{g/ml}$)를 나타낸다. 그러므로, 세포에서 보다 좋은 결합 활성을 갖는 항체는 더 낮은 MPF($\mu\text{g/ml}$)을 갖는다. 표 11, 13-17에서, 값(values)은 키메라 FMC63 및 항-CD19 인간화된 변이 사이의 상대적인 MPF를 나타내고, 하기와 같이 산출되었다: $[1/(\text{MPF 키메라 FMC63} / \text{MPF 항-CD19 인간화된 항체})] \times 100$. 퍼센트(percentage)가 더 높을수록, 항체의 결합 활성이 더 좋다. 도 3은 VH16/VL43 내지 VH16-R94K-Y100_BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 항체의 다른 인간화 단계를 따라 SU-DHL-6 세포에 대한 친화력의 극적인 개선을 보인다. 후자는 FMC63 키메라와 유사한 B 세포에 대한 강한 친화력에 도달한다. 세포에 대한 FMC63 인간화 항체의 친화력 개선은 상기된 것과 같이 인간 CDR-이식 수용체 구조의 결합 특성을 상당히 보유하고 및/또는 개선시키는 돌연변이의 직접적인 결과이다.

실시예 3

[0254] 라지 종양 세포에 대한 항-CD19 인간 항체의 스캐차드 결합 분석(Scatchard binding analysis)

- [0255] 라지-B 종양 세포에 대한 인간화된 항체의 스캐차드 결합 분석(Scatchard binding analysis)
- [0256] 그 표적에 대한 항체의 일정한 결합 친화력(constant binding affinity)은 포화 결합 곡선(saturation binding curve)에 따라 결정될 수 있다. 평형상태(equilibrium)에서, 그 결합 부위에 결합된 및 유리된(free) 항체의 양은 해리 결합 상수(dissociation binding constant) K_d 의 지표(indicative)이다. 대개, 하나의 단일 결합 부위에 대해, 그 기울기(slope)가 결합 상수 K_d 의 역(inverse)과 일치하는 곳에서, 결합된/유리된 것에 대한 결합된 항체의 비율은 선형상관성(linear correlation)이 있다.
- [0257] 검사된 항체는 형광 염색제 이우로퓸(europium; Eu^{3+}) (PerkinElmer, MA, USA)으로 표지되었다. Eu^{3+} 는 세포에 결합된 항체 분자 뿐만 아니라 유리된 항체 분자의 양을 정량화할 수 있는 가능성을 제공한다. 선택된 인간화 후보 항체에 의한 라지 세포에 대한 결합 포화도는 시간차 형광도(time resolved fluorescence)를
- [0258] 사용하여 Eu^{3+} 를 통해 수행되었다. 세포 표면에 대한 Eu^{3+} 염색제의 비특이적 반응(unspecific behavior)없이 Eu^{3+} -표지된 후보 항체의 결합 특이성을 기술하기 위하여, 음성 아형 인간 IgG1(negative isotype human IgG1) 또한 Eu^{3+} 와 함께 표지되었다.
- [0259] 실시예 2에서 기술된 라지 세포를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 올트라글루타민 1(ultraglutamine 1) (Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin) (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)에서 성장시켰다. 상기 세포를 동일한 배양액(culture medium)으로 씻어주고 최종 농도가 1×10^6 세포/ml이 되도록 하였다. 라지 세포의 100 μ l 용량(volume)을 U자 모양의 밀면 96-웰 플레이트(U-bottomed 96-well plate)에 넣었다. PBS-2.5% FBS-0.05% 소듐 아자이드(sodium azide; NaN_3)로 Eu^{3+} -표지된 항체의 일련의 희석물을 분리된 96 웰 플레이트에 준비하고, 4°C로 차갑게 하였다. 각각 Eu^{3+} -표지된 항체 희석물의 100 μ l를 라지 세포로 옮겨주어 Eu^{3+} -표지된 항체 13.3 nM 내지 6.5 pM의 최종 희석 범위에 일치하도록 하였다. 평형상태에 도달할 수 있도록 세포는 얼음 위에서 Eu^{3+} -항체와 15분 동안 배양되었다. 유리된(free) Eu^{3+} -표지된 항체의 양은 세포가 없는 상층액을 옮겨 나누어 담음(aliquot)으로써 측정되었다[용량(volume)은 항체 농도에 따라 경험적으로 조절하였다; 세포는 델피아(Delfia) 용액(PerkinElmer, MA, USA; Eu^{3+} 형광의 개선제)의 100 μ l를 포함한 새 플레이트에서 2분동안 1300RPM으로 회전되었다]. 상층액을 완전히 제거하기 위하여, 세포를 한번 더 2분 동안 1300RPM에서 회전시켰다. 2번째 원심분리 후, 상기 상층액을 버리고, 세포를 차가운 결합 완충액(binding buffer: PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3)의 200 μ l로 2번 씻어주었다. 세포 펠렛(pellet)을 델피아 용액의 100 μ l로 다시 섞어주었다. 시간차 형광도는 2개의 플레이트(유리된 또는 결합된 Eu^{3+} -항체) 모두에서 분광 광도계(spectrophotometer) [Bio-Tek, synergy2, VT, USA; 400 μ s의 시간 지연(time delay) 및 1000 μ s의 획득시간(acquisition time)과 함께 들뜸 파장(excitation wavelength)은 340nm, 방출 파장(emission wavelength)은 615nm이다]를 사용하여 측정되었다. 해리 상수 K_d 는 결합된 것에 대한 결합된/유리된 것의 선형(linear representation)의 기울기가 $1/K_d$ 를 나타내는 곳에서, 스캐차드 분석에 의해 결정되었다. K_d 는 각각의 항체에 대해 이중(duplicate)으로 하여 결정되었고, 각각의 형광도 측정은 삼중(triplicate)으로 하여 수행되었다. 상기 결합 검사에 부합되게, 도 4의 A 및 도 4의 B는 항체 VH16-R94K/VL43(K_d = 47nM) 내지 항체 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A(K_d = 10.9nM)의 다른 돌연변이 단계에 따라 현저한 K_d 개선을 보인다. 후자의 항체는 모의 키메라 FMC63(11.8nM)에 대해 개선된 K_d 를 가진다.
- [0260] 이우로퓸(europium)-표지된 FMC63 키메라 및 표지되지 않은 항-CD19 인간화된 항체에서 결합 경쟁(binding competition) 또는 K_i 결정
- [0261] 각각의 인간화된 항체의 결합 친화력을 평가하는 또 다른 방법은 라지 세포에서 모의 키메라 FMC63 항체(parental chimeric FMC63 antibody)에 대한 결합 경쟁을 측정하는 것이다. 라지 세포에 발현된 CD19 항원에 대한 이우로퓸-표지된 키메라 FMC63(Eu^{3+} -FMC63)의 결합을 억제하기 위해서, 표지되지 않은 항체의 증가된 농도를 일정한 양의 Eu^{3+} -FMC63와 함께 첨가하였다. 상기 목표에 대하여, 10 % 우태아혈청(Chemie Brunschwig AG,

PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1(Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)에서 1×10^6 세포/ml의 농도로 준비된 라지 세포의 100 μ l의 용량을 U자 모양 밀면의 96-웰 플레이트에 넣는다. PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3 를 사용하여 경쟁 항체의 일련의 희석물을 분리된 96-웰 플레이트에 준비하고, 그 후 일정량의 Eu^{3+} -FMC63와 혼합하였다. 상기 항체 희석물을 4°C로 식힌 후 100 μ l를 라지 세포에 첨가하였다. 표지되지 않은 인간화된 항체의 최종 희석물은 100nM에서 4.2pM까지의 범위인 반면 Eu^{3+} -FMC63의 농도는 0.2nM로 유지시켰다. 세포를 상기 항체들과 15분 동안 배양하였다. 평형 상태에 도달한 후, 상기 세포들을 2분 동안 1300RPM에서 원심분리 하고 그 상층액을 제거하였다. 세포 펠렛을 차가운 결합 완충액 PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3 의 200 μ l로 2번 씻어주고, 텔피아 용액의 100 μ l로 다시 섞어주었다. Eu^{3+} -FMC63에 결합된 세포는 상기에 기술된 것과 같이 시간차 형광도를 사용하여 측정되었다. 웰 당(per well) Eu^{3+} -FMC63(fmole)의 양은 표지되지 않은 항체의 총량에 대한 것으로 결정되어 나타내었다. Eu^{3+} -FMC63의 억제 결합 곡선(inhibition binding curve)은 단일 부위 경쟁 모델(one-site competition model) 및 0.2nM의 총 리간드(total ligand) 고정 농도를 사용하여, 그래프패드 프리즘 5 소프트웨어(CA, USA)에서 분석되었다; 억제 결합 상수는 나노몰(nanomolar)의 범위이다. 표 20에서 보여듯이 그리고 상기 나타난 실험에 따라, 돌연변이를 포함하지 않는 구조 VH16VL43는 라지 세포에 대해 낮은 친화력(72.8nM)을 나타내는 반면, 인간화된 변이 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A는 FMC63 키메라와 동등한(1.9nM 내지 1.4nM) 매우 높은 친화력을 나타낸다. 표준편차와 함께 결과는 최소한 3번 결정되었다.

표 20

인간화된 항-CD19 항체의 K_i 결정.

항체	K_i (nM)
FMC63 키메라	1.4 ± 0.32
아형 대조군(isotype control) IgG1	경쟁없음(No competition)
VH16/VL43	72.8
VH16-R94K/VL43	7.6
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	3.9 ± 1.02
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	2.1 ± 0.5
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	1.9
VH16-Y32F-R94K-Y97F/VL43-V3Q-T7S-N92A	49.9

실시예 4

항체-의존적 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)의 활성 검사

인간화된 항-CD19 항체의 ADCC 활성은 사이토 독스 96 비-방사선활성 세포독성 검사 키트(CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit) (Promega, Madison, USA)를 사용하여 젖산 탈수소화효소-분비 검사(lactate dehydrogenase; LDH-releasing assay)에 의하여 측정되었다. 인간 말초 혈액 단핵구(Human peripheral blood mononuclear cells; PBMC)는 표준 피콜-플라크 분리(standard Ficoll-paque separation)에 의해 시트르산 첨가된 전체 혈액(citrated whole blood)으로부터 정제되어, 완전 배지[10% 우태아혈청(FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1 (Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 및 인간 IL-2의 100U/ml(Sigma, Missouri, USA)]에 다시 섞어주고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그 다음날, PBMC를 원심분리에 의해 모은 후, 2번 씻어주고 8×10^6 세포/ml의 밀도로 배양액에 다시 섞어주었다. 실시예 2에 기술된 것과 같이 CD19⁺ 세포주 라지는 표적 세포로 사용되었다. 라지 세포는 2번 씻어주고 0.2×10^6 세포/ml의 밀도로 완전 배지에 다시 섞어주었다. 1.5 μ g/ml로 희석

된 항체의 50 μ l(최종 농도는 0.5 μ g/ml이다)을 표적세포의 50 μ l와 혼합하고 동일한 용량의 PBMC와 U자 모양의 밀면 96-웰 플레이트에 첨가한다. 1:40의 표적 대 작용기 비율은 전체 실험에서 사용되었다. 37°C에서 4시간 동안 배양한 후, 세포를 원심분리하고 세포가 없는 상층액의 50 μ l 샘플을 수집하여, 평평한 밀면의 96-웰 플레이트(flat-bottomed 96-well plate)에 옮기고, 검사하였다. 세포용해(lysis)의 퍼센트를 하기와 같이 산출하였다: [샘플 분비(sample release)-표적 자발적 분비(target spontaneous release)-작용기 자발적 분비(effector spontaneous release)]/[최대 분비(maximum release)-표적 자발적 분비]*100; 여기에서 표적 자발적 분비는 표적세포만 있는 웰(well)로부터의 형광도이고, 작용기 자발적 분비는 작용기 세포만 있는 웰로부터의 형광도이며, 최대 분비는 용해 버퍼(lysis buffer)가 처리된 표적세포를 포함한 웰로부터의 형광도이다. 항체가 없을 때(표적+ 작용기 세포) 수득된 세포용해의 백그라운드 퍼센트(background percentage)를 샘플 세포용해의 퍼센트에서 제한한다(subtract). 도 5의 A 및 도 5의 B는 IgG1 대조군 때문에 낮은 특이성 라지 세포용해를 보인다. 하지만, VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A 항체 또는 VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 항체 또는 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 또는 키메라 FMC63의 인간화된 항체에 의해 유도된 세포용해는 최소한 3배 증가하였다[도 5의 A는 3개의 다른 공여체의 평균±표준편차를 보이고, 도 5의 B는 삼중(triplicate)으로 수행된 1 공여체로부터의 결과±표준편차를 보인다]. 상기 데이터는 CD19⁺ 발현하는 세포에 대해 선택된 인간화된 항-CD19 항체가 모의 키메라 FMC63과 유사한 세포 독성을 초래한다는 것을 보여준다.

실시예 5

[0265] 항-CD19 항체에 의한 세포자멸사(apoptosis)의 유도

[0266] 항체에 의해 유도된 세포 사멸(cell death)를 측정하기 위하여, 실시예 2에 기술된 것과 같이 10% 우태아혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1(Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)에서 라지 세포를 1×10^6 세포/ml로 준비하고, 96-웰 플레이트에 웰 당 100 μ l 또는 24-웰 플레이트에 1ml을 넣어준다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 15분 내지 24시간 동안 0.0016 내지 1 μ g/ml(0.01 μ M 내지 6.6 μ M)의 농도 범위의 항체와 함께 배양하였다. 배양 후, U자 모양의 밀면 플레이트에 있는 세포를 1300RPM에서 3분 동안 원심분리하고 PBS 200 μ l로 씻어주었다. 1x 결합 버퍼(BD Pharmingen, Allschwil, Switzerland)의 100 μ l를 각각의 웰에 첨가하고, 아넥신 V-FITC의 2.5 μ l 및 프로피듐 아이오딘(propidium iodine; PI) (BD Pharmingen, Allschwil, Switzerland)의 2.5 μ l를 첨가하였다. 세포 유동 분석 이전에 세포는 상온에서 아넥신-V 및 PI와 배양되었다. 아넥신-V 및 PI의 이중 염색(double staining)은 죽은 세포 집단(population)을 특징지어주고, 동시에 살아있는 세포는 아넥신-V 또는 PI의 그 어떤 것에 의해서도 염색되지 않는다.

[0267] 도 6은 1 μ g/ml 항체와 2.5시간 동안 배양된 라지 세포의 아넥신-V 및 PI 염색을 보여준다. 충분히 놀랍게도, VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 및 VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 인간화된 항-CD19 항체는 강한 아넥신-V 염색, 세포 사멸을 유도하고, 모의 키메라 FMC63은 세포자멸사에 어떠한 영향도 미치지 않는다. 중요하게는, 도 6에서 관찰되는 키메라 FMC63 처리 후 아넥신-V 염색의 미세한 증가는 재현성이 없고 유의적으로 중요하지 않다. 현저하게는, 인간화된 항-CD19 항체의 첨가하고 이중 염색(아넥신-V와 함께 PI)이 인간화된 항-19 항체와 4시간 배양한 후, 15분 정도의 빠른 시간에 아넥신-V에 의해 염색된 세포가 안정기(plateau)에 도달하였다(보여지지 않음). 라지 세포에서 항-CD19 항체에 의한 세포자멸사 메커니즘은 항-FasL에 의해 유도된 세포자멸사와 상이하다. 사실상, FasL는 라지 세포에서 아넥신-V 염색을 유도하지 않았다(보여지지 않음). 상기 결과는 인간화 항-CD19 항체에 새로운 특성을 주었다는 것을 입증한다. 모의 키메라63과 비교하여 동형(homotypic) 세포 부착(보여지지 않음)을 유도할 수 있는 능력 뿐만 아니라, 인간화된 항-CD19 항체에 의해 주어질 새로운 세포자멸사의 특징은 예측하지 못했을 뿐만 아니라 항-CD20 항체의 연구에 관련하여 매우 중요하다. 사실상, Beers et al.는 강한 세포 자멸사 및 동형의 부착 특성을 갖는 항-CD20 항체는 동물에서 보다 좋은 B 세포 고갈(depletion) 능력을 가진다는 것을 보여주었다(Beers S.A. et al., 2008, Blood 112, p4170-4177). 또한, 라지 세포는 항-CD19 항체를 첨가한 후 15분의 빠른 시간에 아넥신-V로 염색되었다. 상기 염색은 4시간 배양 후 안정기(plateau)에 도달하였다. 이러한 빠른 세포자멸사는 항-CD20 항체보다 우월한 것이고, 이러한 세포자멸사 효과는 일반적으로 24시간 후에 관찰되었다(Chan H.T.C. et al., Cancer Research, 63:5480-5489).

실시예 6

[0268] 시험관 내(in vitro)에서 악성 B 세포 증식(proliferation)의 억제

[0269] **증식-알라마블루(alamarBlue)**

[0270] 항체에 의한 세포 증식의 억제를 측정하기 위하여, 세포(실시예 2에 기술된 것과 같은 라지 또는 SU-DHL-6)를 2×10^5 세포/ml의 밀도에서 웰 당 100 μ l씩 넣어주었다. 세포를 이전에 멸균되고, 최종 농도가 0.0016 내지 1 μ g/ml(0.01 μ M 내지 6.6 μ M)에 도달하도록 10% 우태아혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1(Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)에 희석한 항체 100 μ l와 배양한다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 배양한다. 알라마블루(AbD Serotec, Dusseldorf, Germany)의 20 μ l를 4 내지 8시간 동안 세포에 첨가한다. 자라는 세포는 알라마블루의 형광도에서 화학적 감소를 초래하고, 이것은 들뜸(excitation) 540nm 및 방출 620nm에서 모니터링된다. 처리되고 처리되지 않은 세포(vehicle only)의 퍼센트 차이는 삼중(triplicate)으로 수행된 실험으로부터 산출되었다. 도 7의 A는 항체와 72시간 배양 후 SU-DHL-6의 증식 정도를 보여준다. 관계없는 IgG1 및 SU-DHL-6에 강하게 결합하는 항-HLA-DR 항체는 음성 및 양성 대조군으로 각각 사용되었다. 인간화된 항체 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A, VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 및 VH16-R94K-Y100BF / VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A(보여지지 않음)은 0.01 μ g/ml만큼 낮은 농도에서도 세포 증식을 강하게 억제하는 기능을 가진다. 따라서, 세포자멸사의 초기 유도와 함께, 항-CD19 항체는 B 세포 증식을 72시간 이내에 차단한다.

[0271] **클론 형성능력(clonogenicity)**

[0272] 클론 형성능력 검사는 인간화된 항-CD19 항체에 의한 세포 사멸을 측정할 수 있는 또 다른 방법이다. 상기 방법은 항체의 항-증식적 기능을 평가하기 위해서 일반적으로 사용된다(Chan HTC, Cancer Research 2003). 우리는 클론을 형성하는 세포(colony-forming cell assay) 및 완전 메토컬트 배지(complete MethoCult medium)(StemCell Technologies, Grenoble, France)사용하여 클론 형성능력 검사를 수행하였다. 라지 세포(실시예 2에서 기술된 것과 같은)는 1×10^6 세포/ml로 준비하고 96-웰 플레이트에 100 μ l/웰로 넣어주었다. 그 후 세포를 이전에 멸균되고, RPMI-1640 배지[(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 10% 우태아혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1(Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된, 항체 농도가 0.2 μ g/ml이다] 항체 100 μ l와 90분 동안 배양하였다. 100 μ l에 세포의 수 500개에 도달하도록 라지 세포와 항체를 이스코브 배지(Iscove's medium)에 희석하고, 최종적으로 1.1ml의 메토컬트 배지(MethoCult medium)와 혼합하였다. 투베르클린 주사기(tuberculin syringe)를 사용하여 35mm x 10mm 접시(dish)에 상기 제조의 0.8ml을 넣었다. 세포를 9일 동안 37°C(5% CO₂)에서 배양하였고 현미경(50x 확대)을 사용하여 콜로니의 수를 세었다. 도 7의 B에 나타난 그 결과는 이전에 실시예 5에서 관찰된 놀라운 세포자멸사 특성을 가진(아넥신-V와 함께 PI 염색) 인간화된 항체와 유사하게 상응하였다. 인간화된 항체는 놀랍게도 좋은 항-증식 특성을 갖는 반면 모의 키메라 FMC63은 클론 형성능력에 있어서 매우 적은 효과를 갖거나 또는 아예 효과가 없었다. 인간화된 항-CD19 항체는 세포자멸사를 유도하여 사멸시키는 것 또는 세포 분열(cell division)을 억제시키는 것 중 하나 또는 그 두가지 모두에 의해 라지 클론의 수를 매우 강하게 감소시켰다. 이 실험은 이중(duplicate)으로 수행되었고 여러가지 실험 중 대표적인 것이다. 상기 결과는 B 세포 사멸(killing) 및 증식의 억제에 대한 인간화된 항-CD19 항체의 효과를 확인시켜준다.

실시예 7

[0273] 항-CD19 단일클론 항체의 내재화(internalization)

[0274] **홈-잡(Hum-Zap)을 사용한 내재화 검사법(assay)**

[0275] 항체 내재화를 측정하기 위하여, 독소 사포린(toxin saporin)과 결합한 2차 항-인간 항체(Hum-Zap, Advanced

Targeting Systems, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 내재화된 리보솜-불활성화된 단백질(ribosome-inactivating protein)인 사포린을 세포 사멸을 유도할때, 이것은 알라마블루 검사법(alarabarBlue assay)을 사용하여 모니터링될 수 있다. 실시예 2에서 기술된 것처럼 라지 세포를 10% 우태아혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1(Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)에 1×10^5 세포/ml로 준비하여 웰 당 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어주었다. 항체를 RPMI-1640 완전 세포 배지(상기)에 100ng/10ml로 미리 준비된 Hum-Zap에 희석시켰다. Hum-Zap과 함께 혼합된 항체의 $10 \mu\text{l}$ 를 라지 세포에 첨가하였다. 항체의 최종 농도는 0.5 내지 $0.005 \mu\text{g/ml}$ 의 범위이다. 그 후, 항체와 함께 세포는 알라마블루를 사용하여 세포독성을 측정하기 전에 48시간 동안 배양되었다. 세포 증식의 퍼센트(percentage)는 하기와 같이 산출되었다: 항체 처리된 세포(antibody-treated cell)의 형광도(방출 590nm)/대조군 세포(오직 Hum-Zap만 처리된)의 형광도(방출 590nm) $\times 100$. Hum-Zap 없고 항체와 함께 있는 대조군 또한 수행되었고, 이는 48시간 후 세포 증식에 있어서 유의적인 효과가 보이지 않았다. 우리는 인간화된 항-CD19 항체의 내재화를 관찰하였다(도 8). 항체와의 상호결합에 이어지는 CD19의 내재화는 이전의 연구에서 이미 기술되었지만 라지 세포 및 말초 혈액(peripheral blood)으로부터의 새로운(fresh) B 세포에서 6시간 후 유의적이지 않는 것으로 남아있고 24시간 후 거의 남아있지 않는다(Ingle G.S. et al, BJH, 2007, 140, p 46-58). Hum-Zap을 사용하여, 인간화된 항-CD19 VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A 항체는 모의 키메라 FMC63과 매우 유사하게 내재화된다. 하지만 항체 VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A는 매우 낮은 내재화를 보이고, 10ng/ml에서는 어떠한 내재화도 보여지지 않았다. 높은 내재화 정도는 세포독성물(cytotoxic-payload) 또는 독소(toxin)와 결합되어 사용되도록 고안된 치료제 항체(therapeutic antibody)에서만 바람직하다.

실시예 8

- [0276] 시차 주사 열량 측정법(differential scanning calorimetry measurements)에 의한 항-CD19 단일클론 항체의 내열성
- [0277] 인간화된 항-CD19 단일클론 항체 및 키메라 FMC63의 내열성은 표 8, 12-16, 및 19에서 보여지듯이 열량측정법을 사용하여 비교되었다. 단일클론 항체 녹는점 프로파일(melting profile)은 그들 아형(isotype)의 특성이지만 (Garber and Demarest (2007), BBRC 355:751-7), FAB 단편의 중간 녹는점(mid-point melting temperature)은 전체-길이 IgG에서조차 쉽게 동정될 수 있다. 그러한 FAB 부분(portion)의 중간 녹는점은 인간화된 후보항체의 단일클론 안정성(monoclonal stability)을 모니터링하기 위해 사용되었다.
- [0278] 열량 측정법(calorimetric measurements)은 VP-DSC 시차 주사 미열량측정기(VP-DSC differential scanning microcalorimeter) (MicroCal, Northampton, UK)에서 수행되었다. 세포의 용량(volume)은 0.128ml 이었고, 가열속도는 $1^\circ\text{C}/\text{분}(\text{min})$ 이었으며, 초과압(excess pressure)은 64p.s.i로 유지되었다. 모든 단백질 단편은 PBS(pH 7.4)에서 1-0.5mg/ml의 농도로 사용되었다. 각 단백질의 몰 열용량(molar heat capacity)은 단백질이 추출된 동일한 버퍼를 함유하는 이중 샘플(duplicate sample)의 비교에 의해 측정된다. 부분적 몰 열용량 및 녹는점 곡선은 표준절차(standard procedure)를 사용하여 분석되었다. 온도기록도(thermogram)은 소프트웨어 오리진 v7.0(software Origin v7.0)에서 비-이중 상태 모델(non-two state model)을 사용하여 분석되기 이전에 수전된 기준치(baseline) 및 정규화된(normalized) 농도로 나타내었다.

실시예 9

- [0279] B 세포 고갈 연구
- [0280] 인간 전체 혈액(human whole blood)에서 B 세포 고갈
- [0281] 인간 전체 혈액에서 B 세포를 고갈시킬 수 있는 인간화된 항-CD19 항체의 능력을 조사하기 위하여, B 세포 고갈 검사법을 수행하였다. 말초 혈액(peripheral blood)을 정맥천자(venipuncture)에 의해 수득하고, RPMI-1640 배지[(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 10% 우태아혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1(Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Chemie

Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)이 첨가된]로 2배 희석하였다. 희석된 전체 혈액을 24웰-플레이트 (웰 당 1-2ml)에 넣어주고, 항체 10 µg/ml 또는 PBS(처리되지 않은 것에 첨가)를 첨가하여 플레이트를 37℃, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 혈액을 RBC 용해 버퍼(RBC lysis buffer) (eBiosciences, THP Medical Products, Vienna, Austria)로 상온에서 5분씩 두번 용해시켜주고 1100RPM에서 3분 동안 원심분리를 하였다. 상기 세포 펠렛(pellet)을 결합 버퍼[PBS, 2.5% FCS, 100mg/l MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, 0.05% NaN₃ 및 10% Versene (v/v)]의 2ml로 씻어주었다. 그리고 나서, 세포를 다시 결합 버퍼의 0.5ml에 넣어주었고 항-CD19-PE-Cy5 또는 항-CD20-PE, 또는 항-CD22-FITC 항체 중 하나로 염색하였다. 얼음에서 20분 동안 배양한 후, 세포를 결합 버퍼로 한 번 씻어주고 세포 유동 분석에 의해 분석하였다. B 세포의 퍼센트는 결정되었고 그 퍼센트 변화는 하기와 같이 산출되었다: [처리되지 않은(PBS만 있는) 세포 중에서 B 세포의 % - 항체가 처리된 세포 중에서 B 세포의 %] / [처리되지 않은(PBS만 있는) 세포 중에서 B 세포의 %] x 100.

[0282]

[0283]

항체의 10 µg/ml는 표 21에서 보여지듯이 4명의 혈액 공여자(donor)에서 사용되었고, 전체 혈액에서 B 세포 고 같은 인간화된 항-CD19 항체가 처리된 후에 관찰되었다. 대조군 IgG1 처리 후에는 B 세포의 수에 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 키메라 FMC63과 배양했을 때 일반적으로 CD19⁺ 또는 CD20⁺ 또는 CD22⁺ B 세포를 나타내는 9 내지 10%의 림프구 집단은 가장 효율성이 낮다(평균=7.25%).

표 21

[0284]

전체 혈액으로부터 B 세포의 고갈.

항체 (10 µl/ml)	% 변화				
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	평균(average)
항체 없음 (PBS)	0	0	0	0	0
대조군 IgG1	0	0	0	0	0
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	5	4	22	19	12.5±8.0
VH16-R94K-Y100F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	15	20	10	16	15.25±3.5
키메라 FMC63	0	10	12	7	7.25±4.54

실시예 10

[0285]

증진된 보체-매개 작용기 기능을 갖는 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 변이(variant)

[0286]

많은 변이는 증진되는 보체 의존적 세포 독성(complement dependant cytotoxicity; CDC)을 갖도록 고안되었다. Fcγ 수용체(receptor) 결합과 상호결합하는 Fc가 ADCC를 매개하는 것과 동일한 방법에서, 보체 구성요소 C1q와 상호작용하는 Fc는 CDC를 매개한다. 비록 최근에 Fc/C1q 복합체(complex)에 이용가능한 구조가 없지만, 몇가지 연구는 C1q에 대한 인간 IgG에서 결합 부위를 잔기 D270, K322, P329 및 P331에 중심을 갖는 부위(region)로 지도화 하였다(Idsogie et al., The Journal of Immunology, 2000, 164:4178-4184). VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A에 대해 증진된 CDC를 매개할 수 있는 변이를 찾아보기 위하여, 아미노산 변형은 CH2 도메인의 D269-K334 부위에서 고안되었다.

[0287]

상기 연구는 위치(position) E269, S298 및 S324에서 잔기의 치환(substitution)은 최소한 1.6배(도 9) 내지 최대 5.5배(도 10) 증가된 CDC를 갖는 변이를 야기한다는 것을 보였다.

[0288]

그들의 변이 cDNA 암호화 서열을 만들기 위하여, VH16 R94K 중쇄(서열 번호: 64) cDNA를 암호화하는 cDNA를 표준 돌연변이 형성과정(standard mutagenesis)에 의해 중쇄 VH16 R94K/324(NNK), VH16 R94K/S298A(서열 번호: 114), VH16 R94K/E269D/S298A(서열 번호: 115), VH16 R94K/S298A/S324N(서열 번호: 116), VH16 R94K/E269D/S298A/S324N(서열 번호: 117)로 전환시켰다. 위치 324에서 NNK는 20가지 모든 아미노산(랜덤화;

hard randomization)과의 치환을 제공하는 NNK 코돈(codon)을 갖는 코돈을 암호화하는 야생형(wild-type) 세린(serine)의 치환을 나타낸다.

[0289] DNA 서열을 암호화하는 상기 변이들은 CMV 프로모터 및 소의 성장 호르몬 다중-아데닐화 신호(Bovine Growth Hormone poly-adenylation signal)를 갖는 변형된 pREP4(Invitrogen, CA, USA) 벡터에 기초하는 벡터에 연결된다. 상기 발현 벡터에서, 분비는 쥐의 VJ2C 선도 펩티드(leader peptide)에 의해 유도된다.

[0290] 일시적 발현을 위하여, 각각 중쇄 및 경쇄 벡터의 동량을 함께 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine; PEI)를 사용하여, 서스펜션에 적응된(suspension-adapted) HEK-EBNA 세포(ATCC-CRL-10852)로 형질도입하였다. 일반적으로 서스펜션에 $0.8-1.2 \times 10^6$ 세포/ml의 밀도로 있는 세포 100ml을 VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 경쇄를 암호화하는 발현 벡터 50 µg 및 변이 중쇄를 암호화하는 발현 벡터 50 µg를 포함하는 DNA-PEI 혼합물로 형질도입시킨다. 각각의 유전적으로 조작된 체(chain) 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터를 숙주 세포로 도입시킬때, 그 구성물(construct)은 0.1% 플루로닉 산(pluronic acid), 4mM 글루타민(glutamine), 및 0.25 µg/ml 제네티신(geneticin)이 첨가된 배양액(culture medium) (EX-CELL 293, HEK293-serum-free medium, Sigma, Buchs, Switzerland)으로 분비시키기 위해, 4 내지 5일의 기간동안 세포를 더 배양시킴으로써 제공된다. 그 후 상기된 구조물(construct)은 세포가 없는 상층액으로부터 재조합 단백질-A 흐르는 배양액(streamline media) (GE, Switzerland)을 사용하여 정제되었고, 분석에 사용되었다. 상기 변이의 발현량은 표 22에 나열되어 있다.

[0291]

표 22

[0292] VH16 R94K/VL43 V3Q-T7S-P44I-N92A 중쇄 변이의 IgG 일시적 발현 정도.

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

[0293] 라지 세포에 대한 보체 매개 독성(complement mediated toxicity)

[0294] 세포에 기초된 검사법(cell-based assay)가 CDC를 매개하는 변이의 능력을 측정하기 위해 사용되었다.

[0295] 아기 토끼 보체(baby rabbit complement) (Harlan Laboratories, C-0099F, AN VENRAY, The Netherlands)에 의해 변이에 의해 옅소닌화된 라지 세포(variant-opsonized Raji cells)의 세포용해를 모니터 하기 위하여, 세포

용해(lysis)를 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase; LDH)의 분비를 사용하여 측정하였다. 표적 세포를 원심분리하고 다시 완전 배지[10% 우태아 혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 및 1% 울트라 글루타민(Lonza, Verviers, Belgium)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)]에 섞어줌으로써 2번 씻어주었다. 변이-항체를 1 µg/ml의 명시된 최종 농도로 첨가하였다. 야기 토끼 혈청을 완전 배지를 사용하여 7.5%로 희석하고 항체로 옅소닌화된 표적 세포에 첨가하였다. 플레이트는 3 시간 동안 37℃에서 배양되었다. 세포독성은 사이토 독스 96 비-방사선활성 세포독성 검사 키트(CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit) (Promega, Madison, USA)를 사용하여 측정되었다.

[0296] 상기 검사법으로부터의 대표적인 데이터는 도 9 및 도 10에 나타난다.

[0297] 도 9 및 도 10은 IgG1 대조군 항체 때문에 매우 낮은 특이적 세포용해를 보인다(Herceptin® Roche Pharma A.G., Reinach, Switzerland); 하지만, 보체에 의해 유도된 세포용해는 라지 세포 생존도(viability)의 다양성 때문에 검사법의 다양성에 따라 VH16 R94K/S324N(서열 번호: 118)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 항체에 대해 최소 1.6배(도 9) 내지 최대 5.5배(도 10)로 증가하였다; VH16 R94K/S298A/S324N(서열 번호: 116)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 항체 및 VH16 R94K/E269D/S298A/S324N(서열 번호: 117)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 항체 모두 모항체보다 개선된 CDC(최소 4.4배)를 나타내었다. 도 9 및 10은 삼중(triplicate)±표준편차의 결과를 보인다.

실시예 11

[0298] 증진된 항체-의존적 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)을 가진 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 변이(variant)

[0299] 위치 E269, S298에서의 잔기가 치환된 실시예 10에서 기술된 연구에서 조사된 항-CD19 항체 변이의 ADCC를 유도하는 능력을 알아보기 위해 조사하였다.

[0300] 항체의 ADCC 활성은 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase; LDH)-분비 검사법에 의해 사이토 독스 96 비-방사선활성 세포독성 검사 키트(CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit) (Promega, Madison, USA)를 사용하여 측정되었다.

[0301] 인간 말초 혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)를 시트르산 첨가된 전체 혈액(citrated whole blood)으로부터 표준 피콜-플라크 분리(standard Ficoll-paque separation)에 의해 정제하여, 완전 배지 [10 % 우태아 혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 2mM 울트라글루타민 1(Lonza, Verviers, Belgium) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), 및 인간 IL-2의 100U/ml (Sigma, Missouri, USA)이 첨가된 RPMI-1640 배지]에 다시 넣고, 37℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날, PBMC를 원심분리에 의해 수거하여, 2번 씻어주고 다시 배양액에 8×10^6 세포/ml의 밀도로 넣었다. 실시예 2에서 기술된 것과 같은 CD19⁺ 세포주 라지를 표적 세포(target cell)으로 사용하였다. 라지 세포를 2번 씻어주고 완전 배지에 0.2×10^6 세포/ml로 다시 넣어준다. 1.5 µg/ml로 희석한 항체 50 µl(최종농도는 0.5 µg/ml이다)를 표적 세포의 50 µl와 혼합하고, U-자 모양의 밀면인 96웰 플레이트에서 동량의 PBMC를 첨가하였다. 실험에서 표적 대 작용기의 비율은 1:40으로 사용되었다. 37℃에서 4시간 동안 배양한 후, 세포를 원심분리시키고 세포가 없는 상층액의 50 µl 샘플을 수거하여, 평평한 밀면의 96웰 플레이트(flat-bottomed 96-well plate)로 옮겼다. 세포용해의 퍼센트는 하기와 같이 산출되었다: [샘플 분비(sample release) - 표적 자발적 분비(Target spontaneous release) - 작용기 자발적 분비(effector spontaneous release)] / [최대 분비(Maximum release) - 표적의 자발적 분비(Target spontaneous release)] * 100; 여기서, 표적 자발적 분비는 오직 표적 세포만 포함한 웰로부터의 형광도이고, 작용기 자발적 분비는 오직 작용기 세포만 포함한 웰로부터의 형광도이며, 최대 분비는 세포용해 버퍼(lysis buffer)를 처리한 표적 세포를 포함한 웰로부터의 형광도이다. 샘플의 용해의 퍼센트로부터 항체가 없는 곳에서(표적 세포+ 작용기 세포) 수득한 세포용해 백그라운드 퍼센트(background percentage)를 제하였다(subtraction). 도 11은 IgG 대조군 항체(Herceptin®, Roche Pharma A.G., Reinach, Switzerland) 때문에 특이적이지 않은 라지 세포용해, 및 모 항체에 대한 약간의 세포독성을 보인다; 보여진 데이터는 한 공여자(donor)로부터 분리된 PBMC를 이용하여 평균 세포독성 퍼센트(mean cytotoxicity percentage)±삼중 웰(triplicate well)의 SD이다. 하지만, 항체에 의해 유도된 세포용해

(antibody-induced lysis)는 VH16-R94K/S298A(서열 번호: 114) -VL43- V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 항체에 대해 최소한 5배 및 VH16-R94K/E269D/S298A(서열 번호: 115) -VL43- V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 항체에 대해 최소한 6.8배 증가하였다. 이 데이터는 선택된 항-CD19 항체 변이가 CD19⁺를 발현하는 세포에 대해 증진된 세포독성을 가진다는 것을 나타낸다.

실시예 12

- [0302] 인간 Ig-감마3 및 인간 Ig-감마1/Ig-감마3 연결부위(hinge)-Fc 도메인 혼성(domain shuffling)으로부터 유래된 아미노산 치환에 기초하여 증진된 보체-매개 작용기 기능(complement-mediated effector function)을 갖는 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 변이
- [0303] 인간 IgG3 항체는 일반적으로 인간 IgG1 항체보다 증진된 CDC를 갖는데, 이것의 부분적으로 IgG1 Fc 보다 IgG3 Fc가 더 높은 C1q-결합 친화력(C1q-binding affinity)을 갖기 때문이다(Schumaker VN et al., Biochemistry, 1976, 15:5175-81).
- [0304] VH16 R94K의 Fc 부위에서 아미노산 변형은 인간-IgG3 및 인간 IgG1 Fc 부분(portion) 사이의 서열 상이성에 기인하여 일어났다. 상보적인 접근(complementary approach)에서, 증진된 CDC를 갖는 항 CD19 항체의 키메라 아형을 제공하기 위하여, 인간 IgG3의 연결부위(hinge) 및 불변 도메인(constant domain)과 인간 IgG1 연결부위(hinge) 및 불변 도메인(constant domain)을 혼성시켰다.
- [0305] 상기 연구는 위치 K274 및 N276의 치환 및 CH1 및 IgG1으로부터의 연결부위(hinge) 및 IgG3로부터의 Fc로 구성된 키메라 변이(chimeric variant) (1133 접미사에 의해 명명됨)가 각각 1.7 및 2.2배의 증가된 CDC를 초래하는 것을 보였다.
- [0306] 위치 K274 및 N276에서 잔기의 치환을 갖는 변형 cDNA(variant cDNA)를 만들기 위하여, VH16 R94K 중쇄(서열 번호: 64) cDNA를 암호화하는 cDNA 서열을 일반적인 돌연변이 형성 기술(standard mutagenesis technique)를 이용하여 중쇄 VH16 R94K/K274Q(서열 번호: 119), VH16 R94K/N276K(서열 번호: 120), VH16 R94K/K334R(서열 번호: 121), VH16 R94K/K274Q/N276K(서열 번호: 122), 및 VH16 R94K/K274Q/N276K/K334R(서열 번호: 123)로 전환시켰다.
- [0307] 또한 상응하는 인간 IgG3 중쇄 유전자(NCBI GenBank accession no. X03604.1, 잔기 161 내지 377)와 함께 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A IgG1를 위한 발현벡터에서 중쇄 유전자의 부분을 치환시킴으로써(카르실 말단으로 카바트 잔기 231을 암호화하는) 인간 항 CD19 VH16 R94K(1133)(서열 번호: 124) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 키메라 아형(chimeric isotype)이 생산되었다.
- [0308] 상기 DNA 서열을 암호화하는 변이는 CMV 프로모터 및 소의 성장 호르몬 다중 아데닐화 신호(Bovine Growth Hormone poly-adenylation signal)를 갖는 변형된 pREP4 벡터(Invitrogen, CA, USA)를 기본으로 하는 벡터에 연결되었다. 상기 발현 벡터에서, 분비는 쥐의 VJ2C 선도 서열(murine VJ2C leader peptide)에 의해 유도되었다. 상기 변이들의 일시적인 발현을 위하여, 각 중쇄 및 경쇄 벡터의 동량을 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine; PEI)를 사용하여 서스펜션에 적응된(suspension-adapted) HEK-EBNA 세포(ATCC-CRL-10852)에 함께 형질도입하였다. 일반적으로 $0.8-1.2 \times 10^6$ 세포/ml의 밀도로 서스펜션에 있는 세포의 100ml에 변이 중쇄를 암호화하는 발현 벡터의 50 μ g 및 VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 경쇄를 암호화하는 발현 벡터의 50 μ g를 포함하는 DNA-PEI 혼합물을 형질도입시킨다. 각각의 조작된 체(chain) 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터를 숙주 세포로 도입시킬때, 상기 구조물(construct)은 그 후 0.1% 플루로닉 산(pluronic acid), 4mM 글루타민(glutamine), 및 0.25 μ g/ml 제네티신(geneticin)이 첨가된 배양액(culture medium) (EX-CELL 293, HEK293-serum-free medium, Sigma, Buchs, Switzerland)으로 분비시키기 위해 4 내지 5일의 기간동안 세포를 배양함으로써 제공된다. 그 후 상기 구조물은 세포가 없는 상층액으로부터 재조합 스텐라인 r단백질 A 매지(recombinant Streamline rProtein A media) (GE, Switzerland)를 사용하여 정제되고, 그 후 분석을 위해 사용되었다.
- [0309] 상기 변이의 발현 정도는 표 23에 나열되어 있다.

표 23

[0310] VH16 R94K/VL43 V3Q-T7S-P44I-N92A 중쇄 변이의 IgG 일시적 발현 정도.

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

[0311] 라지 세포에서 보체 매개 독성(Complement mediated toxicity)

[0312] 세포이 기초된 검사법(cell-based assay)는 실시예 10에 따른 CDC를 매개하는 변이의 능력을 측정하기 위해 사용되었다. 변이에 의해 옅소닌화된 라지 세포의 아기 토끼 보체(Harlan Laboratories, C-0099F, AN VENRAY, The Netherlands)에 의한 세포용해를 모니터하기 위해, 세포용해는 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase; LDH)의 분비를 이용하여 특정되었다. 표적 세포를 원심분리 및 다시 넣어섞어줌(resuspension)으로써 완전 배지[10% 우태아혈청(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland) 및 1% 울트라글루타민(Lonza, Verviers, Belgium)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland)]로 2번 씻어주었다. 변이-항체를 1 µg/ml의 명시된 최종 농도로 첨가하였다. 아기 토끼 혈청을 완전 배지를 사용하여 5%로 희석하고 항체로 옅소닌화된 표적 세포에 첨가하였다. 플레이트는 37°C에서 3시간 동안 배양되었다.

[0313] 세포독성은 사이토독스 96 비방사선활성 세포독성 검사 키트(CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit) (Promega, Madison, USA)를 사용하여 측정되었다. 이 검사법으로부터의 대표적 데이터를 도 12에 보였다.

[0314] 도 12는 IgG1 대조군 때문에 낮은 특이적 세포용해를 보인다. 모의 항체와 비교할때(parent antibody), 보체에 의해 유도된 세포용해는 VH16 R94K/K274Q/N276K(서열 번호: 122) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 항체에 대해 최소한 1.7배, VH16 R94K(1133)(서열 번호: 124) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65)항체에 대해 최소한 2.2배 증가되었다. 도 12는 삼중(triplicate)으로 수행될 결과 ±표준 편차를 보여준다.

실시예 13

[0315] 항-CD19 항체의 발현을 위한 세포주 제작(establishment)

[0316] 높은 생산량(yielding)을 갖는 포유류 단백질 발현 시스템이 개발되었다. 상기 시스템은 화학적으로 정의된 혈청이 없는 배지(chemically defined serum-free medium), 매우 효율적인 형질도입 방법 및 클론 집단(clonal population)의 동정을 위해 스크리닝 하는 전략에서 관련 자료가 많은, 부유 성장(suspension growth)에 적응된 CHO 세포주(CHO-S, Invitrogen, Basel, Switzerland)을 기본으로 하였다. 상기 포유류 단백질 발현 시스템은 항 CD19 항체의 인간화된 변이의 안정적 발현(stable expression)을 위해 사용된다.

[0317] 경쇄 및 중쇄 삽입부분(inserts)을 분비시키기 위하여, 실시예1에서 사용된 VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 경쇄(서열 번호: 65)의 cDNA 서열을 포함하는 플라스미드 및 VH16 R94K 중쇄(서열 번호: 64)의 cDNA 서열을 포함하는 플라스미드 pAE18_VH16_R94K를 *Xba*I and *Hind*III를 사용하여 모두 절단하였다. 상기 삽입부분을 겔 전기영동, 겔-추출, 정제에 의해 분리하고, 프로메가(Promega) (Madison, WI, USA)로부터의 pGL3을 기본으로 하고 상기 동일한 제한효소를 사용하여 미리 절단되고 상기 동일한 겔 전기영동 및 정제 방법을 사용하여 준비된 발현 벡터의 다중 클로닝 부위(multiple cloning site)로 클로닝하였다. 이것은 2개의 발현 플라스미드를 제공한다: 각각 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 항 CD19 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 pGL41[18_HC] 플라스미드 및 pGL41[18_LC] 플라스미드.

[0318] 제네티신(geneticin) 내성 유전자 *neo*를 발현하는 벡터 pSV2neo를 클론테크(Clonetech) (Mountain View, CA, USA)에서 구입하였고, 푸로마이신 내성 벡터 pSV-Puro는 SV40 프로모터 및 pBABE-Puro(Addgene, Cambridge, MA, USA)의 푸로마이신 내성 유전자(puromycin resistance gene; *pac*) 를 프로메가의 pGL3에 클로닝함으로써 획득되었다. 상기 4개의 플라스미드는 암피실린 내성 유전자(ampicillin resistance gene; *ampR*)에서 단일 제한 부위(single restriction site)를 사용하여 선형화되었고 남아있는 염으로부터 에탄올 침전(ethanolic precipitation)에 의해 정제되었다. 유사하게, 인간화된 변이[VH16 R94K/Y100pF(서열 번호: 66) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 및 VH16 R94K/Y100pF(서열 번호: 66) -VL43 V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A(서열 번호: 67)]를 위한 발현 벡터는 상기 기술된 것과 같이 동일한 제한 효소를 사용하여 절단되고 pGL41 백본

(backbone)으로 클로닝 되었다.

- [0319] 숙주 세포주 CHO-S(Invitrogen)으로의 안정적인 통합을 위하여, 세포를 1×10^6 세포/ml의 밀도에서 10ml을 50ml 바이오리액터 필터 튜브(bioreactor filter tube) (TPP, Trasadingen, Switzerland)에 넣고 하룻밤 동안 배양한다. 형질도입 이전에, 화학적으로 정의된 세포 배양액(PowerCHO2, Lonza, Basel, Switzerland)을 형질도입 배지(Opti-MEM, Invitrogen)으로 대체하였다. 제조사의 지침에 따라 중쇄 및 경쇄 발현 플라스미드, pSV-Puro 및 pSV2neo의 혼합물을 포함하는 선형화된 벡터 콕테일(linearized vector cocktail)의 12.5 µg을 세포에 폴리케타이온 형질도입제 JetPEI(polykationic transfection agent JetPEI) (Polyplus-transfections, Illkirch, France)를 사용하여 형질도입시킨다. 형질도입 4-5시간 후, 세포를 성장 배지의 1 부피로 희석하였다. 다음날 세포를 푸로마이신(puromycin) 5.0 µg/ml 및 제네티신(geneticin) 500 µg/ml을 포함하는 성장 배지에서 1 대 10, 1 대 20 또는 1 대 30의 비율로 희석하고 96웰 플레이트에 나누어 담았다. 선별의 14일 후, 약물 내성 콜로니는 항체 특이적-ELISA를 사용하여 검사되었고 양성의 개별 클론은 항체 생산 분석을 위해 증폭되었다. 가장 좋은 성장을 보인 클론은 클론 집단을 수득하기 위해 세포 배양액(PowerCHO2, Lonza)에서 농도 1, 10 및 100 세포/ml로 희석되었다. 최종적으로, 최고로 생산하는 클론은 글루타민이 첨가된 PowerCHO2 세포 배양액을 사용한 흔들리는 배지 검사법(shaken-batch assay) 12일에서 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 항체에 대해 400 내지 600mg/l 및 VH16 R94K/Y100F-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 및 VH16 R94K/Y100F -VL43 V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A 항체에 대해 200-300mg/l의 범위에서 역가(titer)를 생산하였다.

실시예 14

- [0320] 항 CD19 항체의 탈푸코실화된 변이(defucoylated variant)의 생성
- [0321] 포유류에서, 푸코오즈(fucose) 잔기는 거의 모든 복합체-타입 Asn-연결된 올리고사카라이드(complex-type Asn-linked oligosaccharides)의 가장 안쪽의 GlcNAc 잔기에 1,6 연결(linkage)을 통해 결합되어 있다. 쥐의 베타-1,4-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코사민일트랜스퍼라아제(rat beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase; GNTIII) 효소를 발현하는 안정한 세포주를 준비하였다. 상기 효소는 예를 들면 항체와 같은 당단백질의 N-연결된 올리고사카라이드(N-linked oligosaccharides)에서 이등분된 N-아세틸글루코사민(bisecting N-Acetylglucosamine)을 도입시킨다. 이러한 변형은 항체의 Fc 올리고사카라이드의 푸코오즈 잔기를 글리칸 나무(glycan tree)의 환원된 N-아세틸글루코사민으로 전이시키는 효소 Fut8에 대해 접근할 수 없는 기질로 바꾸어 놓아(Longmore and Schachter, 1982, Carbohydr Res 365-92), 따라서 푸코실화(fucosylation)을 억제하게 된다. 쥐의 gntIII 유전자를 Imagenes(Berlin, Germany)으로부터 수득되었고 특이적 프라이머를 사용하여 증폭되었다. 그 후 앰플리콘(amplicon)은 효소 BamHI 및 HindIII를 사용하여 절단되었고, 겔 정제되어, 발현 벡터 pGLEX33의 BamHI, HindIII로 열린 다중 클로닝 위치로 클로닝되었다; 인비트로젠(Invitrogen, Basel, Switzerland)으로부터의 pcDNA3.1 플라스미드를 기본으로 하고 쥐(mouse) CMV 프로모터에 의해 조절되는 포유류 발현 벡터. 그 결과의 벡터를 pGNTIII이라고 한다.
- [0322] 푸로마이신 내성 유전자 벡터 pSV-Puro를 SV40 프로모터 및 pBABE-Puro(Addgene, Camebridge, MA, USA)로부터의 푸로마이신 내성 유전자(pac)를 프로메가(Madison, WI, USA)의 pGL3 벡터에 클로닝함으로써 수득하였다. 상기 2개의 플라스미드를 암피실린 내성 유전자(ampicillin resistance gene; ampR)에서 단일 제한 부위(single restriction site)를 사용하여 선형화하고 남아있는 염으로부터 에탄올 침전에 의하여 정제하였다.
- [0323] 숙주 세포 CHO-S(Invitrogen)로의 안정적인 통합을 위하여, 1×10^6 세포/ml 밀도의 세포 10ml을 50ml 바이오리액터 필터 튜브(TPP, Trasadingen, Switzerland)에 넣고 하룻밤동안 배양하였다. 형질도입하기 이전에, 화학적으로 정의된 세포 배양액(owerCHO2, Lonza, Basel, Switzerland)을 형질도입 배지(Opti-MEM, Invitrogen)으로 대체하였다. 세포에 pGNTIII 및 pSV-Puro의 혼합물을 포함하는 선형화된 벡터 콕테일의 12.5 µg를 폴리케타이온 형질도입제 JetIII(Polyplus-transfections, Illkirch, France)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 형질도입시켰다. 형질 도입 4-5시간 후, 세포를 성장 배지 1용량과 희석하였다. 다음날 세포를 5.0 µg/ml의 푸로마이신을 포함한 성장 배지에 1 대 10, 1 대 20, 또는 1 대 30의 비율로 희석하여 96웰에 분배하였다. 선별 14일 후, 쥐 GNTIII 유전자(rat GNTIII gene)를 발현하는 약물 내성 콜로니를 분리하였다.
- [0324] 두 번째 안정적 세포주를 인비트로젠(Invitrogen)의 CHO-S 세포주를 사용하여 준비하였다. 인간 H6 프로모터

및 tRNA^{Val} 프로모터의 조절하에 전에 기술된 shRNA 서열을 사용하여(Imai-Nishiya et al. 2007, BMC Biotechnol., 7:84) 상기 세포에 효소 Fut8(α 1,6-fucosyltransferase) 및 GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)를 녹다운(knock down) 시키는 2개의 작은 머리핀 RNA(small hairpin RNA; shRNA)를 도입시켰다. 상기 구조물(construct)를 진아트(A.G.GeneArt A.G., Regensburg, Germany)로부터 얻었다. 상세하게는, tRNA^{Val} 프로모터는 Fut8 특이적 shRNA의 발현을 조절하고 U6 프로모터는 GMD 특이적 shRNA의 발현을 조절한다. 상기 구조물(construct)를 NheI 및 NruI의 옆에 두고, 상기 제한 부위(restriction sites)를 절단되고 겔 정제된 단편을 미리 동일한 제한효소로 절단된 pGLEX1(pcDNA3.1(Invitrogen)의 변형된 형태)의 백본(backbone) 벡터에 클로닝시키는데 사용하였다.

[0325] 상기 세포들이 푸코오즈가 결핍된 곳에서 배양될 때, 드노보 경로(de-novo pathway)의 상기 2개의 효소의 혼합된 녹다운은 IgG1의 N-연결된 올리고사카라이드 구조(N-linked oligosaccharide structure)에서 푸코오즈의 부재를 촉진하는 것에서 서로 상호적인(synergistic) 효과를 갖는 것으로 보여졌다(Imai-Nishiya et al. 2007, BMC Biotechnol. 7:84). 푸코오즈의 존재하에서, GMD 효소는 재활성 경로(salvage pathway)의 부분이 아니기 때문에 푸코실레이션의 감소는 Fut8 효소의 녹다운에 의존할 것이다. 이중 녹다운 발현 카세트(double knockdown expression cassettes)가 형질도입된 세포는 N-연결된 올리고사카라이드에서 푸코실화의 90 내지 98% 손실을 갖는 것으로 이전에 보여졌다(Imai-Nishiya et al. 2007, BMC Biotechnol., 7:84). 숙주 세포주 CHO-S(Invitrogen)로의 안정적인 통합을 위해 siRNA 벡터를 암피실린 내성에서 단일 제한 부위를 사용하여 선형화하였다. 세포는 선별 플라스미드(selection plasmid)와 함께 형질도입되었고 상기 기술된 것과 같이 선별되었다.

[0326] 2개의 세포주는 일시적으로 상기 실시예 1 및 실시예 11에서 기술된 것과 같이 각각 VH16 R94K (서열 번호: 64) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (서열 번호: 65) 항체 및 VH16 R94K/E269D/S298A (서열 번호: 115) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (서열 번호: 65) 항체 모두를 암호화하는 플라스미드로 형질도입되었다.

[0327] 일시적 형질도입을 위하여, 1×10^6 세포/ml 밀도의 세포 200ml을 1000ml의 둥근 스코트 병(round Schott bottle)에 넣어주고 하룻밤 동안 배양하였다. 형질도입 이전에, 화학적으로 정의된 세포 배양액(PowerCHO2, Lonza)을 형질도입 배지(Opti-MEM, Invitrogen)로 대체하였다. 세포에 50% 중쇄 및 50% 경쇄 DNA의 혼합물이 포함된 벡터 각테일의 250 μ g을 폴리케타이온형 형질도입제 JetPEI (Polyplus-transfections)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 형질도입시켰다. 형질도입 4-5 시간 후, 세포를 성장 배지의 1용량과 희석하였다. 5일째, 배지를 수거하였다. 원심분리 후, 상기 상층액을 여과시키고(0.2 μ m) Akta 정제 시스템(Akta purifier system, GE healthcare)에서 단백질-A 친화성 크로마토그래피(protein-A affinity chromatography) (Hitrap, GE healthcare, Zurich, Switzerland)에 의해 정제하였다. ADCC는 실시예 11에 기술된 것과 같이 수행되었다.

[0328] 상기 기술된 shRNA 및 GNTIII 세포주에서 만들어진 항체 변이는 각각 shRNA 또는 GNTIII의 접미사로 명명되었다. 도 13은 탈푸코실화된 변이는 그들의 푸코실화된 모 항체보다 최소한 2배 증가된 ADCC를 갖는다는 것을 보인다.

실시예 15

[0329] 인간화된 SCID 쥐(SCID mice)에서 B 세포 접목(engraftment)에 대한 항-CD19 항체의 효과

[0330] 본 연구는 huPBL SCID 쥐(mouse)의 항-CD19 처리의 생체내(in vivo)효과를 처리하기 위해 고안되었다. 처리하기 전에, 5-6주령(5-6 weeks-old) 및 16-20g의 무게가 나가는 30마리의 건강한 중증 복합형 면역 부전증(severe combined immunodeficiency; SCID, HARLAN) 암쥐(female mice)를 몸무게에 의거하여 무작위적으로 2마리의 한 군 및 7마리의 4 군으로 나누었다. 각 군의 평균 몸무게는 유사하고 다른 군과 통계적으로 다른지 않는다[변화량(variance) 분석]. 그 후 모든 쥐는 0번째 날(D0)에서 γ -선(γ -source)를 사용하여(1.8 Gy, 60Co, INRA BRETENIERE, Dijon, France) 전체 몸에 방사선을 조사하였다. 1번째 날(D1) 및 8번째 날(D8)에, 쥐는 20mg/kg의 NK 세포가 결핍된 Ab(NK-cell depleting Ab) (mCD122 antigen, Rat IgG2b isotype, TM-Beta 1, BioXCell, USA)의 단일 SC 주입을 받았다.

[0331] 건강한 자원 공여자로부터 4개의 신선하게 수거된 버피 코트(buffy coat) 샘플을 수거하였고 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)를 총 혈액 수거 48시간 이내에 피콜 플라크(Ficoll-Paque®)와 그 절차에 따라 농도구배 원심분리(gradient centrifugation)를 사용하여 정제하였다(Ref 07907, StemCell Technologies). PBMCs의 생존도(viability)는 생체내 주입(*in vivo* injection) 이전에 0.25% 트립판 블루 배제(trypan blue exclusion)에 의해 조사되었다. 3번째 날, 쥐는 공여자(donor) #1, #2 및 #3 (군 2 내지 5, 공여자 당 쥐 2-3 마리)로부터 3×10^7 hPBMCs(PBS에서의 $500 \mu\text{l}$ IP 경로) 또는 PBS(군 1)이 IP 주입되었다. 14번째 날, 군 2, 3, 4 및 5로부터의 쥐는 각각 허셉틴®(Herceptin®)(음성 대조군 21.0mg/ml, Batch N° B1492) 맵테라®(Mabthera®)(양성 대조군, 10.0mg/ml, Batch N° B2136), 10mg/kg/주입(inj)의 항-CD 19 항체 변이 VH16 R94K(서열 번호: 64)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65) 또는 항-CD 19 항체 변이 VH16 R94K/S324N(서열 번호: 118)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A(서열 번호: 65)의 단일 IV 주입을 받았다. 처리 일정은 하기 표 24에 요약한다:

표 24

[0332] 처리 일정(treatment schedule).

군	쥐의 수	방사선 (irradiation)	NK 세포 고갈 AB (NK-cell depleting AB) (D1, D8)	HPBMC(D3)	처리 (D14, Q1Dx1)
1	2	있음	있음	없음(PBS)	없음
2	7	있음	있음	3 공여체 2-3 쥐/공여자	허셉틴(Herceptin®) (10mg/kg, IV)
3	7	있음	있음	3 공여체 2-3 쥐/공여자	맵테라(Mabthera®) (10mg/kg, IV)
4	7	있음	있음	3 공여체 2-3 쥐/공여자	VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (10mg/kg, IV)
5	7	있음	있음	3 공여체 2-3 쥐/공여자	VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (10mg/kg, IV)

[0333] 비장(spleen)에서 인간 B 림프구는 4가지 색의 세포 유동 분석에 의해 탐지되었다. 각각의 샘플에 대하여, 상기 인간 B 림프구 세포는 hCD45(+), mCD45(-), hCD20(+) 및 hCD19(+)의 세포 표면 발현 및 PKH26 참고 마이크로비드(reference microbeads) (Ref P7458, Sigma)을 사용하여 정량화되었다. 하기 표 25에 기술된 항체가 사용되었다.

표 25

[0334] 인간 B 림프구 세포의 탐지에 대한 항체.

항원	클론	아형(isotype)	형광	참조(Ref)
hCD19	4G7	쥐(mouse) IgG ₁ , κ	PerCP	BD ^a 345778
hCD45	H130		APC	BD 555485
hCD20	L27		FITC	BD 345792
mCD45	30-F11	쥐(rat) IgG ₁ , κ	APC-Cy7	BD 557659

mIgG ₁	MOPC-21	쥐(mouse) IgG ₁	FITC	BD 555748
mIgG ₁	X40		PerCP	BD 345817
mIgG ₁	MOPC-21		APC	BD 555751
rIgG _{2b}	A95-1	쥐(rat) IgG _{2b} , κ	APC-Cy7	BD 552773

[0335] ^aBD: 벡톤 디킨슨 바이오사이언스(Becton Dickinson Bioscience, Le Pont de Claix, France)

[0336] CD 마커 발현 분석을 위해, 비장(spleen)으로부터 염색 버퍼[PBS (Ref 17-516F, Lonza), 0.2% BSA (Ref A7030, Sigma) 0.02% NaN₃ (Ref S2002, Sigma)] 200 μl 안의 100000 세포를 어두운 곳에서 20분 동안 상온에서 hCD19 PerCP, hCD20 FITC, hCD45 APC 및 mCD45 APC-Cy7 항체가 혼합된 용액 또는 mIgG1-FITC, rIgG2b-APC-Cy7, mIgG1-APC 및 mIgG1-PerCP 항체가 혼합된 용액 중 하나 함께 배양하였다. 아형 대조군(isotype control) 항체는 각각의 경우에 음성 대조군으로 사용되었다.

[0337] "고정 및 용해(fix and lyse)" 과정을 사용하여 적혈구를 용해시켰다. 간단하게, 고정 및 용해 버퍼를 IO 테스트 3 10X 고정 용액(IO Test 3 10X Fixative Solution) (Ref A07800, Beckman Coulter)의 25 μl를 벌사라이즈 (VersaLyse) (Ref A09777, Beckman Coulter)에 첨가함으로써 준비하고, 그 혼합물의 1ml을 염색된 세포에 첨가하였다. 볼텍스(vortex) 하고 상온 어두운 곳에서 10분 동안 배양한 후에, 세포를 원심분리하고 염색 버퍼의 3ml로 한번 씻어주고 참고 마이크로비드(reference microbead) 용액(PKH26, Ref P7458, Sigma, 염색버퍼로 1/2 희석)의 0.5ml에 다시 넣어주었다. 상기 샘플을 FACS 분석할 때까지 빛 노출로부터 보호된 얼음에 보관하였다. 상기 염색된 세포를 488nm 파장 레이저 들뜸(laser excitation)을 사용하여 사이플로우[®] 스페이스 세포 유동 분석기(CyFlow[®] space flow cytometer) (Partec S.A.R.L.)에 의해 분석하였다. 각각의 샘플에서 총 10,000 hCD45(+) (도달한다면)를 수집한 후에, 획득(acquisition)을 정지하였다. 모든 이벤트(event)는 획득하는 동안 저장되었다.

[0338] FACS 결과는 세포의 크기 및 복잡성(complexity)를 가시화하기 위하여 FSC에 대한 SSC 매개변수(parameter) (전방 및 측면 감지기: forward and side scatter detectors)를 나타내는 점 도표(dot plot)에 의하여 및 hCD45(FITC) 형광 강도를 나타내는 점 도표에 의해 보여졌다.

[0339] 세포의 절대 수 세기(absolute cell count)의 산출은 하기의 공식에 의해 이루어졌다:

$$ACN = \frac{CN}{BN} \times \frac{\text{beads concentration}}{2} \times V_f \times \frac{1}{V_i}$$

[0340]

[0341] 여기에서:

[0342] - ACN은 mL 당(per) 세포의 절대 수(absolute cell number)이고,

[0343] - CN 세포 수 이며,

[0344] - BN 비드(bead)의 수이고,

[0345] - 상기 비드 농도는 제조자(manufacturer)에 의해 제공된 배치(batch)에 따라서 후자의 날(the latter date)에서 구체화되었으며,

[0346] - Vf(mL에서 발현되는)는 세포 펠렛을 다시 섞어주는테(resuspend) 사용되는 마이크로비드 용액의 용량이고,

[0347] - Vi(μ L에서 발현되는) FACS 분석을 위해 사용되는 혈액의 초기 용량이다.

[0348] 18일 째 접목된 SCID 쥐의 비장에서 총 B 세포의 각각의 ACN은 도 14에 나타낸다. 18일 째 접목된 SCID 쥐의 비장에서 총 B 세포의 각각 퍼센트를 도 15에 나타낸다.

[0349] 군 hPBMIC 및 항-CD 19 변이 V18(mouse N^o3817)로부터의 한 개의 쥐를 제외한 모든 쥐는 성공적으로 hPBMIC와 접목되었고, 이는 쥐의 혈액에서 순환하는 인간 CD45+ 백혈구의 탐지를 초래하였다. 인간 CD45+ 백혈구(leucocyte)의 수준(level)은 hPBMIC가 이식된 대부분의 쥐의 혈액 세포 15%를 넘었다. 또한, 인간 세포 복원(reconstitution)의 높은 수준(혈액 세포에서 31-73% hCD45+ 백혈구에 도달)은 접목된 쥐의 52%에서 관찰되었다. hCD45+ 백혈구의 수준은 실험하는 동안 변하지 않았거나 또는 증가하였고, 이는 인간 PBMC가 이식된 SCID 쥐의 접목 효율성을 나타낸다. 이식 18일 후 인간 CD45+ 백혈구는 비장에서도 탐지되었고, 평균 접목 수준은 비장 세포에서 거의 45% hCD45+ 세포이었다.

[0350] 비장에서 인간 B 세포 집단은 투여 후 4일째 쥐가 희생될 때 분석되었다; 즉 이식으로부터 18일째 분석되었다. 음성 대조군으로부터 모든 접목된 쥐에서, 비장은 hCD45+ 백혈구에서 5 내지 11% B 세포를 포함하였다. 비장에서 인간 B 세포는 hCD19+ hCD20+ 이중 양성 B 세포(double-positive B cell) 뿐만 아니라 CD19+ 또는 hCD20+ 단일 양성 세포(single-positive cell)로 구성되었다. 인간 B 세포의 매우 낮은 정도(<3%)만이 맵테라[®], 항-CD19 항체 변이 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 또는 항-CD19 항체 변이 VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A가 처리된 쥐의 비장에서 탐지되었고, 상기 인간 B 세포 집단의 감소는 허셉틴[®]과 비교하여 통계적으로 유의적이었다. 반면에, 항-CD19 변이 항체 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 또는 항-CD19 항체 변이 VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 및 맵테라[®] 처리 사이의 비장에서 B 세포 고갈은 통계적으로 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

[0351] 상기 결과들은 10mg/kg에서의 항-CD19 항체 변이 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A 또는 항-CD19 항체 변이 VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A의 단일 IV 주입이 처리된 쥐에서 B 세포 고갈을 초래한다는 것과 GBR 항체에 대한 반응은 맵테라[®](Mabthera[®])의 효과와 강도(intensity)와 동일하다는 것을 보였다.

수탁번호

[0352]

기탁기관명 : DSMZ

수탁번호 : DSM23302

수탁일자 : 20100205

기탁기관명 : DSMZ

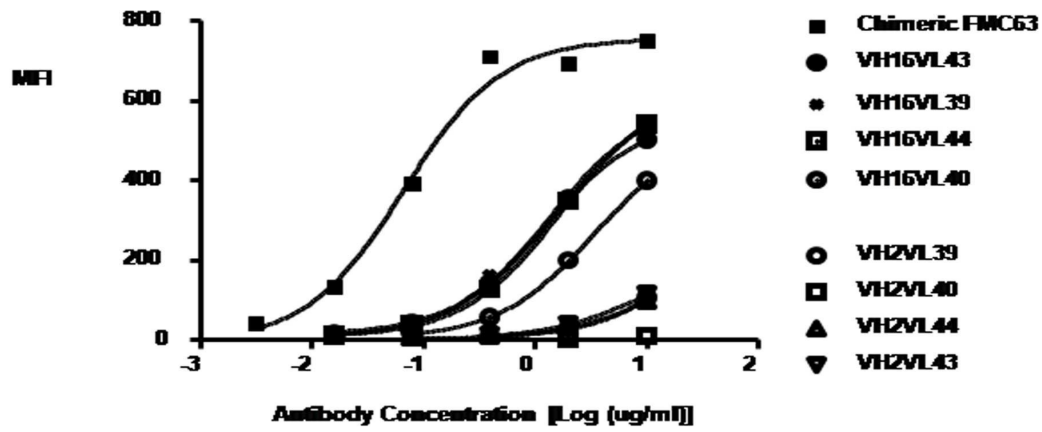
수탁번호 : DSM23303

수탁일자 : 20100205

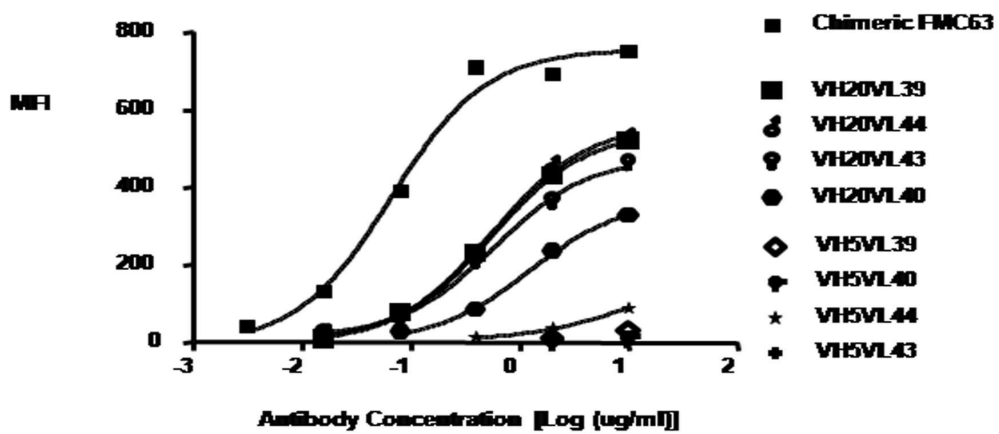
도면

도면1

A



B

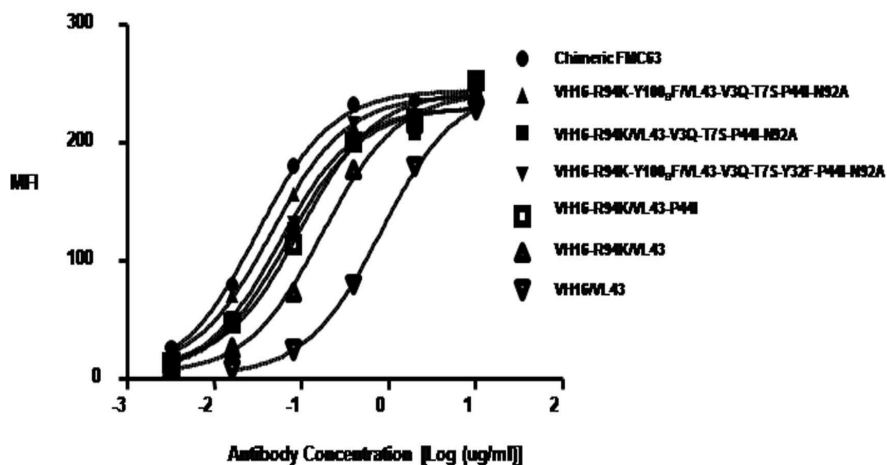


도면2

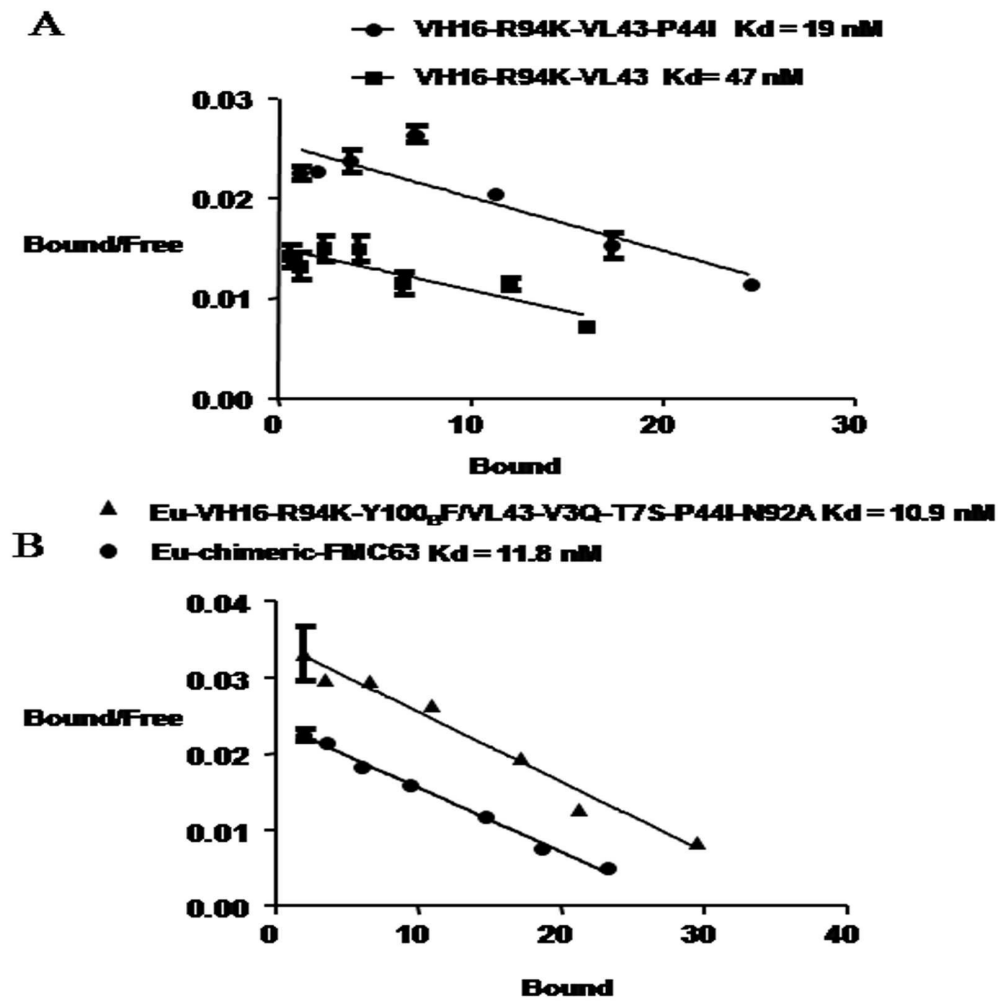
A

[illegible]**B**[illegible]

도면3

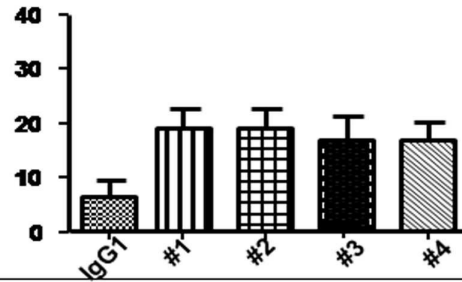


도면4



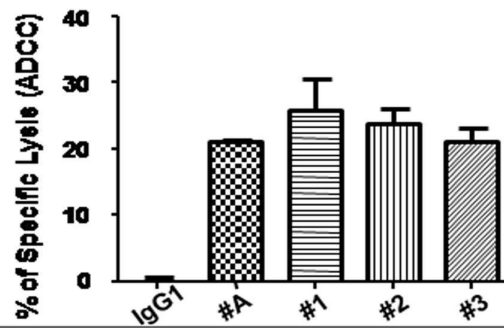
도면5

A % of specific Lysis (ADCC)



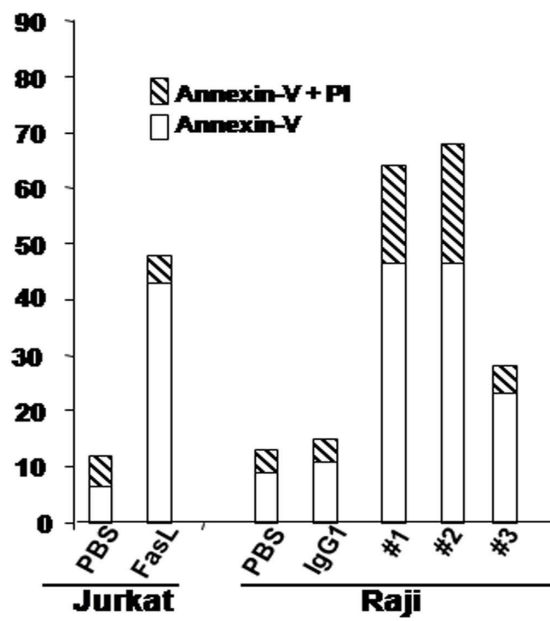
Keys	
Isotype control IgG1	IgG1
VH16-R94K-Y100 _B -FVL43-V3Q-T7S-Y32F-P44-N92A	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B -FVL43-V3Q-T7S-P44-N92A	#3
VH16-R94K/VL43-P44	#4

B



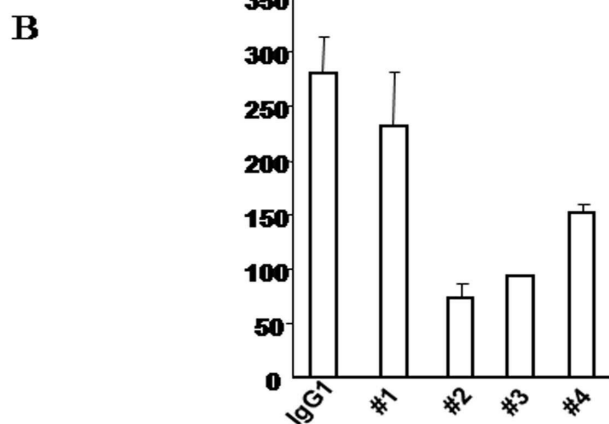
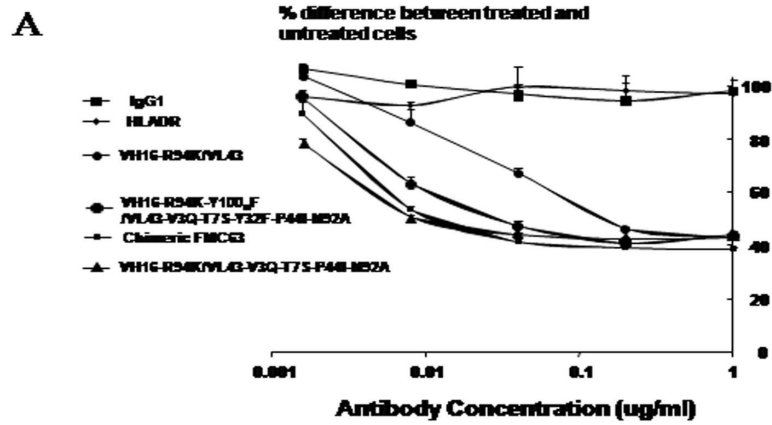
Keys	
Isotype control IgG1	IgG1
Chimeric FMC63	#A
VH16-R94K-Y100 _B -FVL43-V3Q-T7S-Y32F-P44-N92A	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B -FVL43-V3Q-T7S-P44-N92A	#3

도면6



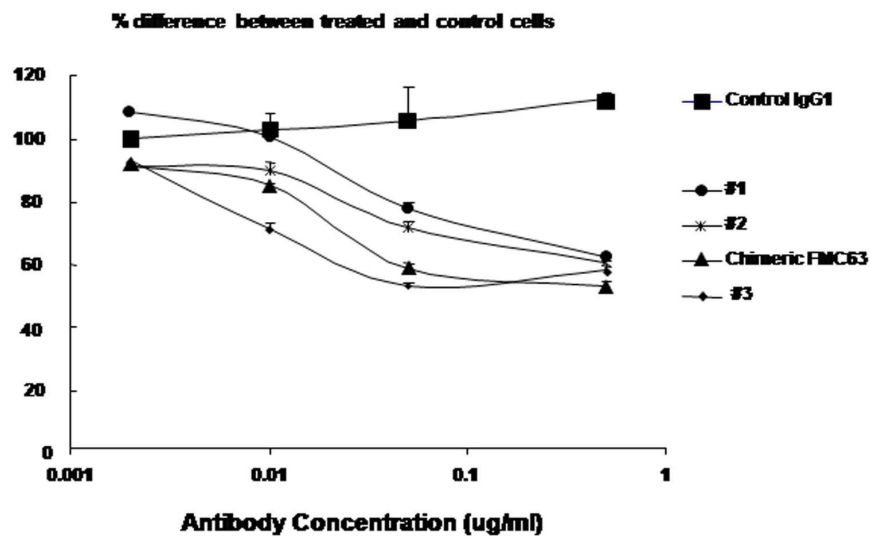
Keys	
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44-N92A	#1
VH16-R94K-Y100F/VL43-V3Q-T7S-P44-N92A	#2
Chimeric FMC63	#3

도면7



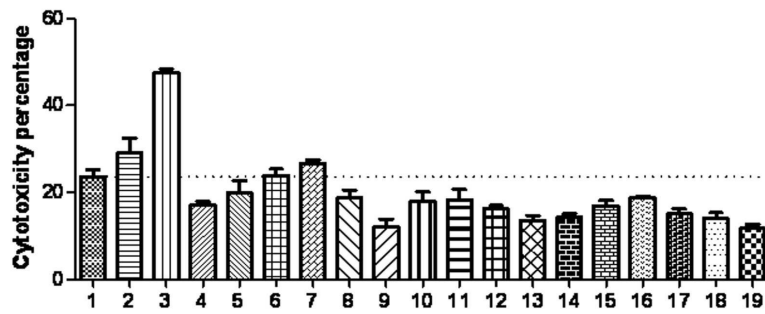
Keys	
Chimeric FMC63	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44 _H -N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _F /VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44 _H -N92A	#3
VH16-R94K/VL43-P44 _H	#4

도면8

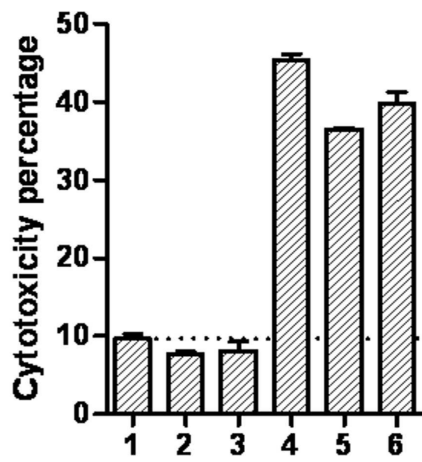


Keys	
VH16-R94K-Y100 _B F/ML43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#1
VH16-R94K-Y100 _B F/ML43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K/ML43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#3

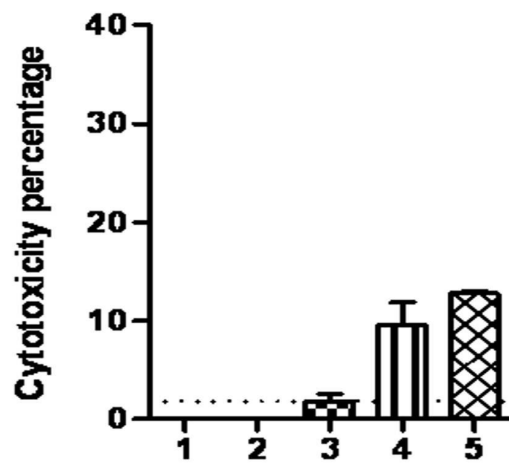
도면9



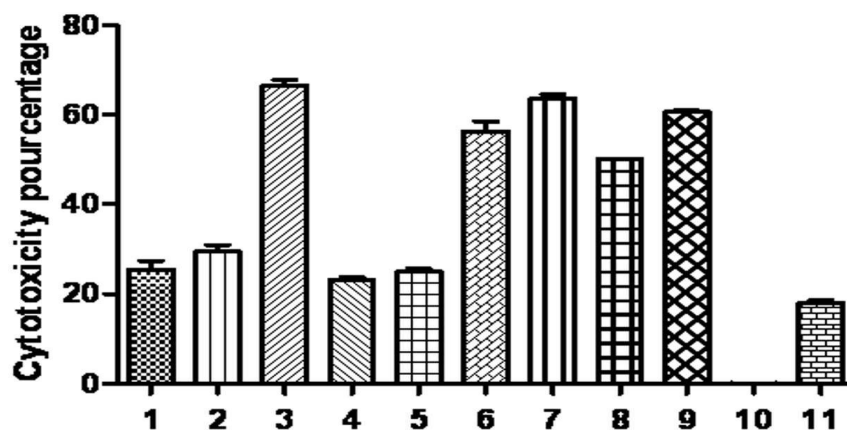
도면10



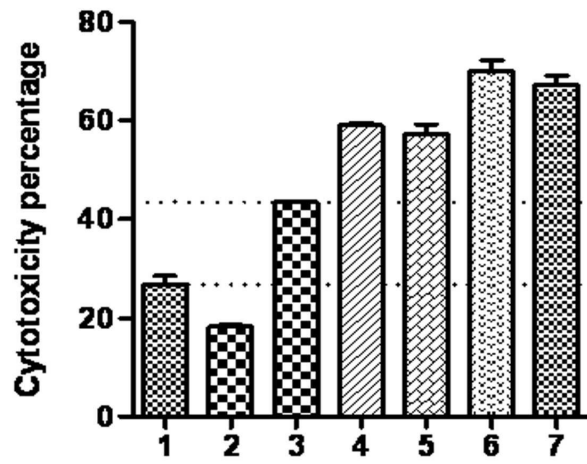
도면11



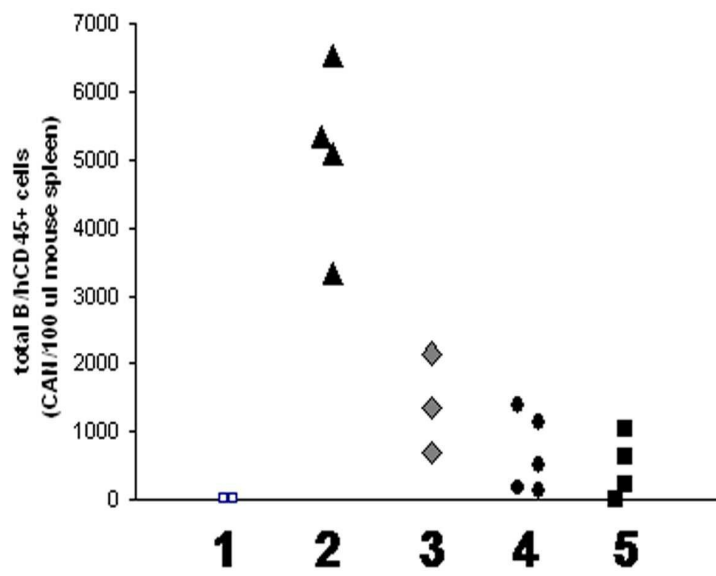
도면12



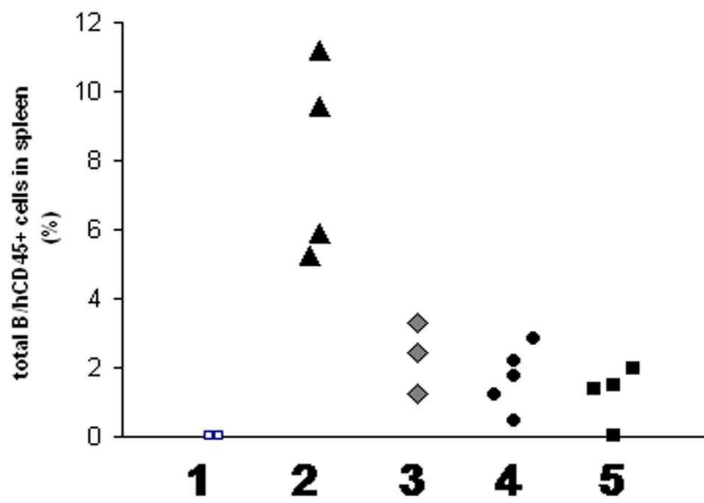
도면13



도면14



도면15



서열목록

- <110> Glenmark Pharmaceuticals SA
- <120> Humanized antibodies that bind to CD19 and their uses
- <130> 11fpi-08-09
- <150> 61/154,524
- <151> 2009-02-23
- <160> 125
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> FMC63-VH NCBI-CAA74659
- <400> 1

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

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FMC63-VL NCBI-CAA74660
 <400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

 100 105
 <210> 3
 <211> 94
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr

85 90

<210> 4

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humIGKV106 [V1-27*01]

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala

85 90

<210> 5

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90

<210> 6

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90

<210> 7

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> donor amplified cDNA clone#39

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> donor amplified cDNA clone#40
 <400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145					150								155								160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser						
				165								170								175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr						
				180								185								190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser						
				195								200								205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys																
				210																	
<210>	9																				
<211>	214																				
<212>	PRT																				
<213>	Artificial Sequence																				
<220><223>	donor amplified cDNA clone#43																				
<400>	9																				
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly						
1					5					10					15						
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr						
				20								25								30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile						
				35								40								45	
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly						
				50								55								60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro						
65					70								75								80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Leu						
				85								90								95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala						
				100								105								110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly						
				115								120								125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala						

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> donor amplified cDNA clone#44

<400> 10

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humIGHV199 [V3-33*01]
<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Arg

<210> 12

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg

<210> 13

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

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

<210> 14
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> humIGHV031 [V3-48*01]
 <400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

<210> 15
 <211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> donor amplified cDNA clone#2

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Ser Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Thr Asp Leu Leu Ala Ala Pro Thr Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr

100 105 110

Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu

130 135 140

Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln

145 150 155 160

Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn

165 170 175

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

180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met

195 200 205

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

210 215 220

Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro

225 230

<210> 16

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> donor amplified cDNA clone#5

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ala Gly Gly Leu Val Ser Ala Ala Gly Arg Ala Ala Pro Arg

100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser

115 120 125

Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp

130 135 140

Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp

145 150 155 160

Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

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

Val Pro Leu Pro
225

<210> 17
<211> 222
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> donor amplified cDNA clone#16
<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser
165 170 175
Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro
180 185 190
Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val
195 200 205

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

<210> 18

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> donor amplified cDNA clone#20

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ser Tyr Ile Val Ser Ser Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Val Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser Ile Met Gly Ala Glu Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu
115 120 125
Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val
130 135 140

Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe
145 150 155 160
Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe
165 170 175
Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu
180 185 190
Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys
195 200 205
Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro
210 215 220
<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VH2
<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95
Thr His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH5
 <400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

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

Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16
 <400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH20

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL39

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL40

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> VL43

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL44

<400> 26

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

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

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr
85	90	95													
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
100	105	110													

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 27

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 28

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 29

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 31

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1	5
---	---

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 32

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1	5
---	---

<210> 33

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16-G42R
 <400> 33

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

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16-F67L
 <400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R71K

<400> 35
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

85 90 95
Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-L78V

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K

<400> 37

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

1 5 10 15

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

				20						25					30				
Gly	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40						45						
Ala	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys				
		50					55					60							
Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu				
		65					70					75						80	
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
						85						90						95	
Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln				
				100					105								110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
				115					120										
<210>		38																	
<211>		107																	
<212>		PRT																	
<213>		Artificial Sequence																	
<220><223>		VL43-P44V																	
<400>		38																	
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly				
	1				5					10					15				
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr				
				20						25				30					
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Ile				
				35						40									
Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly				
		50								55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro				
		65																	
						70							75						80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr				
						85							90						95
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys									

100 105

<210> 39
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43-F71Y
 <400> 39

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

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

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43-Y87F
 <400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

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

100 105

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VL43-V3Q/T7S
<400> 41

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

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

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

100 105
<210> 42
<211> 120
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-Q6E

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-Y32F/R94K

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16-R94K/Y96F
 <400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Phe Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/Y97F

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Phe Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/Y98F

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Phe Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/Y100bF

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-Y32F

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-P44I

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-P44L

<400> 50

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

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Leu Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

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

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-N92A

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-T93V

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

<210> 53
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43-T93A
 <400> 53

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

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

<210> 54
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16-R94K/Y97W
 <400>

54

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Tyr Trp Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 55
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VH16-Y32F/R94K/Y97F
<400> 55
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Phe
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Phe Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-Y32F/P44I

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-V3Q/T7S/N92A

<400> 57

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

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

 100 105
 <210> 58
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43-V3Q/T7S/Y32F/N92A
 <400> 58

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

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

100 105

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-V3Q/T7S/P44I/N92A

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

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

100 105

<210> 61

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-F71H

<400> 61

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

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

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

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

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

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

85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 62

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-F71S

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL43-F71T

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Thr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65						70						75						80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr				
					85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys									
					100					105									
<210>	64																		
<211>	450																		
<212>	PRT																		
<																			
213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	VH16-- R94K heavy chain																		
<400>	64																		
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg				
1					5					10					15				
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr				
				20				25				30							
Gly	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
				35				40				45							
Ala	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys				
				50				55				60							
Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu				
65					70				75				80						
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
				85				90				95							
Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln				
				100				105				110							
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val				
				115				120				125							
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala				
				130				135				140							
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser				
145					150				155				160						
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val				

165	170	175	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
180	185	190	
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195	200	205	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
405	410	415	

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 65
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VL43-- V3Q/T7S/P44I/N92A light chain
<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 66
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VH16-- R94K Y100BF heavy chain

<400> 66
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 67
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43-- V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A light chain
 <400> 67
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
 20 25 30

 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 68

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FMC63 chimeric Heavy Chain

<400> 68

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

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

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

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

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

85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

 Gly Lys
 450
 <210> 69
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FMC63 chimeric Light Chain
 <400> 69
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 70

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Table-1 Fwd Primer

<400> 70

gatcggtatcc actggtgata ttgtgatgac ycagwctcc

39

<210> 71

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Table-1 Rev Primer

<400> 71

gatcgcggcc gcacactctc ccctgttgaa gctctt

36

<210> 72

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Table-2 Fwd Primer I

<400> 72

gatcggatcc actggtgagg tgcagctggt ggagtc	36
<210> 73	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Table-2 Rev Primer	
<400> 73	
gatcgcggcc gctggaagag gcacgttctt ttcttt	36
<210> 74	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CMV-IE Forward	
<400>	
> 74	
cgcaaatggg cggtaggcgt g	21
<210> 75	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BGH Reverse	
<400> 75	
tagaaggcac agtcgagg	18
<210> 76	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VH2 mCDR1 linker Reverse	
<400> 76	
gtcacgccg tagtcgggca ggctcacgcc agacgctgca caggagagtc tc	52
<210> 77	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> VH2 mCDR1 linker Forward
 <400> 77
 ggcggtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc tgggtccgcc aggctccagg 50
 <210> 78
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH2 mCDR2 linker Reverse
 <400> 78
 ggcgctgttg tagtaggttg tctcggagcc ccagatcact gccaccact ccagccctt 60
 g 61
 <210> 79
 <211> 66
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> VH2 mCDR2 linker Forward
 <400> 79
 ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcacat ctccagagac 60
 aattcc 66
 <210> 80
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH2 mCDR3 linker Reverse
 <400> 80
 catggcgtag ctgccgccgt agtagtagtg tgtggtacag taatacacgg c 51
 <210> 81
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH2 mCDR3 linker Forward
 <400> 81
 cactactact acggcggcag ctacgccatg gactactggg gccaggaac cctg 54

<210> 82
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH5 mCDR1 linker Reverse
 <400> 82
 gctcacgccg tagtcgggca ggctcacgcc agaggctgca caggagagtc tc 52
 <210> 83
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH5 mCDR1 linker Forward
 <400> 83
 ggcgtagacc tgcccgacta cggcgtagac tggatccgcc aggtccagg g 51
 <210> 84
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH5 mCDR2 linker Forward
 <400> 84
 ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcaccat ctccagggac 60
 aacgcc 66
 <210> 85
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH5 mCDR3 linker Reverse
 <400> 85
 gtagtccatg gcgtagctgc cgccgtagta gtagtgcccc gcacagtaat aaacggc 57
 <210> 86
 <211>
 > 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH5 mCDR3 linker Forward
 <400> 86
 cactactact acggcggcag ctacgccatg gactactggg gccaggaac cctggtcacc 60
 60
 <210> 87
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16 mCDR3 linker Reverse
 <400> 87
 catggcgtag ctgccgccgt agtagtagtg tctcgcacag taatacacgg c 51
 <210> 88
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH20 mCDR1 linker Reverse
 <400> 88
 gctcacgccg tagtcgggca ggctcacgcc agaggctaca caggagagtc tc 52
 <210> 89
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH20 mCDR2 linker Reverse
 <400> 89
 ggcgctgttg tagtaggttg tctcgagacc ccagatcact gaaacccact ccagccctt 60
 c 61
 <210> 90
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH20 mCDR2 linker Forward
 <400> 90
 ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcaccat ctccagagac 60

aacgcc	66
<210> 91	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VH20 mCDR3 linker Reverse	
<400> 91	
catggcgtag ctgccgccgt agtagtagtg tctcgcacag taatacacag c	51
<210> 92	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SalI adaptor	
<400> 92	
gatcgtcgac gctgaggaga cggtgaccag gg	32
<210> 93	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HindIII VJ2C Forward	
<400> 93	
gatcaagctt gccgccacca tggagacaga cacactc	37
<210> 94	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VL39 mCDR2 linker Forward	
<400> 94	
cacaccagcc ggctgcacag cgggggtccca tcaaggttca gcggc	45
<210> 95	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> VL39 mCDR3 linker Reverse

<400> 95

gggtgtagggc agtgtgttgc cttgctggca gtaataagtt gcaaaatcat c 51

<210> 96

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL39 mCDR3 linker Forward

<400> 96

cagcaaggca acacactgcc ctacaccttc ggccaaggga ccaaggtgg 49

<210> 97

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL40 mCDR2 linker Reverse

<400> 97

gctgtgcagc cggtgtgtgt gatagatcag gaggttagga ac 42

<210> 98

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL40 mCDR2 linker Forward

<400> 98

cacaccagcc ggctgcacag cgggggtccca tctcggttca gcggc 45

<210> 99

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL40 mCDR3 linker Reverse

<400> 99

gggtgtagggc agtgtgttgc cttgctgaca gtaataagtt gcaaaatctt c 51

<210>

> 100

<211> 48

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL40 mCDR3 linker Forward
 <400> 100
 cagcaaggca acacactgcc ctacaccttc ggcggaggga ccaaggtg 48
 <210> 101
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43 mCDR1 linker Reverse
 <400> 101
 gttcaggtac ttgctgatgt cctggctggc cgggcaagtg atggtgactc tgtctcc 57
 <210> 102
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43 mCDR1 linker Forward
 <400> 102
 cgggccagcc aggacatcag caagtacctg aactggatc agcagaaacc aggg 54
 <210> 103
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43 mCDR2 linker Reverse
 <400> 103
 gctgtgcagc cggtggtgt gatagatcag gagcttaggg gc 42
 <210> 104
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43 mCDR2 linker Forward
 <400> 104
 cacaccagcc ggctgcacag cggggtccca tcaaggttca gtggc 45

<210> 105
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43 mCDR3 linker Reverse
 <400> 105
 ggtgtagggc agtgtgttgc cttgctgaca gtagtaagtt gcaaaatctt c 51
 <210> 106
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL43 mCDR3 linker Forward
 <400> 106
 cagcaaggca acacactgcc ctacaccttc ggccctggga ccaaagtgg 49
 <210> 107
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL44 mCDR1 linker Reverse
 <400> 107
 gttcaggtac ttgctgatgt cctggctggc ccgacaagtg atggtgactc tgtctcc 57
 <210> 108
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL44 mCDR2 linker Reverse
 <400> 108
 gctgtgcagc cggctggtgt gatagatcag gaggttaggg gc 42
 <210> 109
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL44 mCDR2 linker Forward
 <400> 109

cacaccagcc ggctgcacag cgggggccca tcaaggttca gcggc	45
<210> 110	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VL44 mCDR3 linker Reverse	
<400> 110	
ggtgtagggc agtgtgttgc cttgctgaca ataataagtt gcaaaatctt c	51
<210> 111	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VL44 mCDR3 linker Forward	
<400> 111	
cagcaaggca acacactgcc ctacaccttt ggccagggga ccaagttgg	49
<210> 112	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NotI Kappa Reverse	
<400> 112	
gatcgggcc gcttatcaac actctcccct gttgaagc	38
<210> 113	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Table-2 Fwd Primer II	
<400> 113	
gatcggatcc actggtcagg tycagctkgt gcagtctgg	39
<210> 114	
<211> 450	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> VH16-R94K/S298A heavy chain

<400> 114

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
 290 295 300

 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

 Gly Lys
 450
 <210> 115
 <211> 450
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/E269D/S298A heavy chain

<400> 115

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Asp

 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 116
 <211> 450
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/S298A/S324N heavy chain

<400> 116

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 117
 <211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/E269D/S298A/S324N heavy chain

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Asp
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 118
 <211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/S324N heavy chain

<

400> 118

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 119

<211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16-R94K/K274Q heavy chain
 <400> 119

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 120

<211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/N276K heavy chain

<400> 120

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 121
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH16-R94K/K334R heavy chain
 <400> 121
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys

450

<210> 122

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/K274Q/N276K heavy chain

<400> 122

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys

450

<210> 123

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K/K274Q/N276K/K334R heavy chain

<400> 123

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

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

195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 124

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH16-R94K(1133) heavy chain

<400> 124

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys

450

<210> 125

<211> 556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(556)

<223> human CD19

<400> 125

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met

1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp

20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln

35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu

50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile

65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu

85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr

100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp

115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro

130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala

145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro

165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
 180 185 190
 Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
 195 200 205
 Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
 210 215 220
 Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
 225 230 235 240
 Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
 245 250 255
 Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
 260 265 270
 Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
 290 295 300
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320
 Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335
 Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350
 Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365
 Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380
 Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
 385 390 395 400
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415
 Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu

420 425 430
 Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
 435 440 445
 Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
 450 455 460
 Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
 485 490 495
 Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln

 500 505 510
 Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
 515 520 525
 Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
 530 535 540
 Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
 545 550 555