



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월12일

(11) 등록번호 10-1593403

(24) 등록일자 2016년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7002636

(22) 출원일자(국제) 2008년08월08일

심사청구일자 2013년08월07일

(85) 번역문제출일자 2010년02월05일

(65) 공개번호 10-2010-0054791

(43) 공개일자 2010년05월25일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/060464

(87) 국제공개번호 WO 2009/019312

국제공개일자 2009년02월12일

(30) 우선권주장

07114128.7 2007년08월09일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2005017148 A1*

WO2007014278 A2*

WO2007041635 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하

독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173

(72) 발명자

하이더 카를-하인츠

독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173

베링거 인겔하임 게엠베하 체데 파텐츠

보르게스 에릭

독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173

베링거 인겔하임 게엠베하 체데 파텐츠

오슈터만 엘린보르크

독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173

베링거 인겔하임 게엠베하 체데 파텐츠

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 24 항

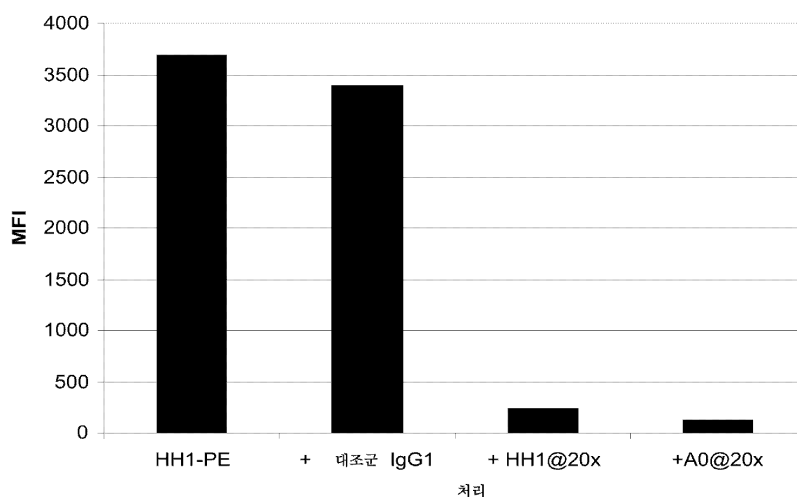
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 항-CD 3 7 항체

(57) 요약

키메라 및 사람화된 항-CD37 항체, 및 이들을 함유하는 약제학적 조성물은 병리에 있어서 B 세포를 수반하는 자가면역 질환, 염증성 질환 및 B 세포 악성종양의 치료에 유용하다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

- i) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄,
 - ii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 및
 - iii) 사람 기원인 불변 중쇄 및 경쇄
- 에 의해 규정되는, 사람 CD37에 결합하는 키메라 항체 분자.

청구항 2

- 제1항에 있어서,
- i) 상기 불변 중쇄가 IgG1 체이고,
 - ii) 상기 불변 경쇄가 카파쇄인, 항체 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 분자가 Fc 도메인에 하나 이상의 효과기 기능을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 보유하는 것인, 항체 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 효과기 기능의 조절이 항체 의존적 세포 매개된 세포독성의 증가인, 항체 분자.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 Fc 도메인의 하나 이상의 돌연변이가 카바트 EU 넘버링 인덱스에 따라 번호매겨진 위치 239 및 332, 또는 236 및 332, 또는 236, 239 및 332에서의 치환의 조합인, 항체 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는, 항체 분자.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는, 항체 분자.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는, 항체 분자.

청구항 9

서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는, 사람 CD37에 결합하는 항체.

청구항 10

서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는, 사람 CD37에 결합하는 항체.

청구항 11

서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는, 사람

CD37에 결합하는 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

활성 성분으로서 제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 항-CD37 항체 분자, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, B 세포 악성종양, 및 병리 과정에 B 세포가 관여하는 염증성 질환 또는 자가면역 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 하나 이상의 다른 치료제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 하나 이상의 다른 치료제가 B 세포 항원 CD20을 표적화하는 제제인, 약제학적 조성물.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 B 세포 악성종양이 B 세포 비호지킨 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병 또는 다발성 골수종 중에서 선택되는, 억제학적 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 항체 분자 또는 상기 항체 분자를 함유하는 억제학적 조성물을 세포 집단에 투여함을 포함하는 CD37 발현 B 세포의 고갈 방법으로서, 당해 방법이 시험관내에서 수행되는 것인, 세포 집단에서 CD37 발현 B 세포를 고갈시키는 방법.

청구항 29

제2항에 있어서, 상기 항체 분자가 Fc 도메인에 하나 이상의 효과기 기능을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 보유하는 것인, 항체 분자.

청구항 30

제5항에 있어서, 상기 치환이 I332E 및 S239D, 또는 I332E 및 G236A, 또는 S239D, I332E 및 G236A인, 항체 분자.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

활성 성분으로서 제6항에 따른 하나 이상의 항-CD37 항체 분자, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, B 세포 악성종양, 및 병리 과정에 B 세포가 관여하는 염증성 질환 또는 자가면역 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 44

활성 성분으로서 제7항에 따른 하나 이상의 항-CD37 항체 분자, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, B 세포 악성종양, 및 병리 과정에 B 세포가 관여하는 염증성 질환 또는 자가면역 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 45

활성 성분으로서 제8항에 따른 하나 이상의 항-CD37 항체 분자, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, B 세포 악성종양, 및 병리 과정에 B 세포가 관여하는 염증성 질환 또는 자가면역 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 46

제6항에 따른 항체 분자 또는 상기 항체 분자를 함유하는 약제학적 조성물을 세포 집단에 투여함을 포함하는 CD37 발현 B 세포의 고갈 방법으로서, 당해 방법이 시험관내에서 수행되는 것인, 세포 집단에서 CD37 발현 B 세포를 고갈시키는 방법.

청구항 47

제7항에 따른 항체 분자 또는 상기 항체 분자를 함유하는 약제학적 조성물을 세포 집단에 투여함을 포함하는 CD37 발현 B 세포의 고갈 방법으로서, 당해 방법이 시험관내에서 수행되는 것인, 세포 집단에서 CD37 발현 B 세포를 고갈시키는 방법.

청구항 48

제8항에 따른 항체 분자 또는 상기 항체 분자를 함유하는 약제학적 조성물을 세포 집단에 투여함을 포함하는 CD37 발현 B 세포의 고갈 방법으로서, 당해 방법이 시험관내에서 수행되는 것인, 세포 집단에서 CD37 발현 B 세포를 고갈시키는 방법.

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 B 세포 고갈을 기반으로 하는 면역요법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 이러한 요법, 예컨대 B 세포 악성종양 및 자가면역 병태의 치료에 사용하기 위한 항-CD37 항체 분자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암과 여타 질환의 치료에 안전하고 선택적인 방법으로, 모노클로날 항체(mAb)를 이용한 면역요법이 최근 생겨나고 있다. 구체적으로, B 세포 고갈을 기반으로 한 요법, 특히 B 세포 악성종양의 치료에 있어서 모노클로날 항체의 역할은 B 세포 표면에 존재하는 CD20 항원에 대해 유도성 항체인 리툽시마브(rituximab)(Rotuxan®)의 도입 이래로 확대되었다. 리툽시마브의 효능은 단독 제제 및 병용 요법으로, 가벼운 NHL(Hiddemann et al., 2005a; Hiddemann et al., 2005b; Hainsworth 2004; McLaughlin et al., 1998), 외투세포 림프종(Forstpointner et al., 2004; Kahl et al., 2006; Foran et al., 2000; Howard et al., 2002; Romaguera et al., 2005), 미만성 대세포성 림프종(DLCL)(Coiffier et al., 1998; Feugier et al., 2005) 및 버킷(Burkitt) 백혈병/림프종(Thomas et al., 2006)에서 수많은 연구를 통해 확인되었다. 하지만, 환자들 중 일부만이 치료법에 반응하고, 대부분은 리툽시마브 치료 후 결국 재발한다. 따라서, B 세포 악성종양의 치료법에 CD20보다 어쩌면 더욱 효과적인 B 세포 상의 새로운 치료 표적이 연구되었다(Zhao et al., 2007). CD37 항원은 지금까지 B 세포 항원 CD20과 동일하게 B 세포 악성종양의 표적으로 생각된 적이 없는 세포 표면 항원이다.

[0003] 테트라스패닌(tetraspanin) 상과의 일원인 CD37은 상당히 글리코실화된 세포 표면 분자로, 4개의 막관통 도메인과 2개의 세포외 루프를 보유한다. CD37은 거의 성숙 B 세포에서만 발현되고, 말초 혈액 B 세포에서 최고의 발현 수준, 형질세포에서 감소된 수준, 골수의 CD10+ 전구체 B 세포에서 검출할 수 없는 수준으로 발현된다. 휴지기 및 활성화된 T 세포, 과립구 및 단핵구에서도 CD37의 낮은 발현 수준이 보고된 바 있다. B 세포 신생물 중에서, CD37 발현은 주로 공격형 비호지킨 림프종(NHL) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서 관찰된다. 또한, CD37의 높은 발현 수준은 외투세포 림프종(MCL)에서도 발현된다. 이러한 발현 패턴은 CD37을 항체 매개된 암 치료법의 매력적인 표적이 되게 한다.

[0004] CD37은 1986년에 최초로 소개되었고 쥐 모노클로날 항체 MB-1에 의해 특성규명되었다(Link et al., 1986).

[0005] CD37의 생리학적 역할은 알려지지 않았다. CD37 결손 마우스는 림프성 기관의 발달 및 세포 조성에 변화가 전혀 없지만, IgG1 수준의 감소 및 T 세포 매개 면역 반응의 약화를 나타낸다(Knobeloch et al., 2000). CD37^{-/-} T 세포를 이용한 연구는 T 세포 증식에서 CD37의 역할을 제안한다(van Spriël et al., 2004).

[0006] 다양한 질환의 악성 B 세포에서도 CD37 발현이 보고되었다. CD37은 버킷 림프종, 소포 림프종 및 림프구성 림프종과 같은 성숙 B 세포 악성종양의 대부분에서 발현된다(Link et al., 1986). CD37의 높은 발현 수준은 모발상 세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병(CLL) 환자의 샘플, 및 비호지킨 림프종(NHL)의 여러 아형, 예컨대 외투세포 림프종(MCL) 환자의 샘플에서 관찰되었다(Schwartz-Albiez et al., 1988; Barrera et al., 2005). 면역표현형 결정을 위해 항체 마이크로어레이를 이용하는 한 보고서는 CD37이 악성 CLL 세포(CD37 고발현) 대 정상 말초혈액(PB) 림프구(CD37 저발현) 간에 양호한 판별인자임을 주장한다(Belov et al., 2001).

[0007] 암세포에 대한 CD37 특이적 mAb의 결합은 다양한 작용 기전을 유발할 수 있다: 첫째, 상기 항체는 CD37 항원의 세포외 도메인에 결합한 후, 보체 캐스케이드를 활성화시키고 표적화된 세포를 용해시킬 수 있다. 둘째, 항-CD37 항체는, 결합된 항체의 Fc 부가 면역계의 세포독성 세포에 존재하는 적당한 수용체에 의해 인식된 후 일어나는, 표적 세포에 대한 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC)을 매개할 수 있다. 셋째, 상기 항체는 항원 또는 여타 자극에 반응하는 B 세포의 능력을 변경시킬 수 있다. 마지막으로, 항-CD37 항체는 프로그램된 세포사(아포토시스)를 개시시킬 수 있다.

[0008] 항-CD37 mAb MB-1은 B-NHL 환자(B-세포 비호지킨 림프종; Press et al., 1989; Kaminski et al., 1992)에서 2가지 방사선-면역요법 실험으로 평가되었다. 한 실험에서는 6명의 재발 NHL 환자에게 치료학적 용량의 ¹³¹I-MB-1을 투여했고, 그 결과 6명 모두 7개월의 정중 기간에 의해 임상적으로 완전한 완화(CR)를 달성했다. 중요한 것은, 환자 6명 중 2명은 MB-1의 추적 용량만을 투여한 후에 이미 임상적 감퇴를 나타냈으며, 이는 항체 자체가

직접적인 항암 효과가 있음을 시사한다. 두번째 실험에서 방사선 표지된 MB-1은 불응성 NHL 환자의 치료에 적용되었고, 그 결과 평가할 수 있는 9명 환자 중 3명에서 제한된 기간의 목적 반응을 나타냈다(Kaminski et al., 1992). 두 실험 모두에서, 추적 용량의 표지된 MB-1 항체를 주사한 후, 말초 B 세포의 빠른 일시적 감소가 보고되었다. 이러한 관찰은 MB-1이 자신에게 세포독성 활성을 발휘한다는 결론을 지지한다. 이를 요약하면, 상기 임상 실험들은 B-세포 악성종양에 대한 CD37 표적화 가능성을 강조하고 항-CD37 치료법의 임상적 적절성의 가능성을 시사한다.

[0009] CD37 특이적 항체와 유사한 단일쇄 분자("Small Modular ImmunoPharmaceutical", SMIP)를 이용한 실험은 상기 분자로의 치료가 시험관내에서 아포토시스를 유도하고 생체내 이중이식편 모델에서 버킷 림프종 성장을 지연시킨다는 것을 증명한다. 최근에는 트루비온에서 재조합 항-CD37 SMIP Tru16.4의 항아포토시스 활성을 기술했다(Zhao et al., 2004). Tru16.4는 종양 환자 유래의 원시 CLL 세포에서 카스파제 독립적인 아포토시스를 유도했다. 이러한 세포에서의 아포토시스 유도는 리톡시마브보다 컸고 CD52 길항제인 알렘투주마브(Alemtuzumab)와 비슷했다. 아포토시스 유도 정도는 CD37 세포 표면 발현과 정비례했고 항-사람 IgG 항체와 가교결합에 의해 더욱 증가될 수 있다. CD37 발현과 ADCC의 상관관계는 시험관내 세포주에서 입증되었다. 버킷 림프종 마우스 모델(Raji)에서는 항-CD37 scFv를 이용한 치료시에 치료학적 효능을 드러냈다(Zhao et al., 2007). 이러한 데이터는 아포토시스 및 ADCC의 유도에 의한 표적이 된 항종양 치료법의 유력한 시도가 CD37 표적화라는 첫번째 증거이다.

[0010] 결론적으로, CD37 항원은 여러 사람 B 세포 악성종양의 종양 세포에서, 그리고 성숙한 정상 B 림프구에서 흔히 발현되고 항-CD37을 기반으로 한 치료법이 B 세포 악성종양을 치료하는 장래가 유망한 시도일 수 있는 것으로 밝혀졌다. CD37 양성인 정상 B 세포의 고갈은 다수 환자들의 임상 데이터에서 항-CD20 mAb에 의한 최고 6개월 동안의 장기적인 B 세포 고갈에도 IgG 혈청 수준의 유의적인 감소 또는 감염 위험의 증가를 일으키지 않는 것으로 나타나기 때문에 중요한 것으로 생각되지 않는다(Van der Kolk et al., 2002).

[0011] 전술한 항-CD37 항체 또는 항체 유사 분자(MB-1 및 SMIP Tru16.4)는 B-세포 악성종양에서 항암 효능 및 CD37을 표적화하는 잠재성을 보여주었지만, B 세포 고갈을 기반으로 하는 치료법을 개선하기 위한 대체 항-CD37 저해제는 여전히 요구되고 있다.

[0012] [발명의 개요]

[0013] 본 발명의 목적은 CD37 양성 B 세포의 고갈에 반응하는 B 세포 악성종양 및 여타 장애를 치료하기 위한 신규 CD37 길항제를 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 목적은 효과기(effector) 기능이 향상된 항-CD37 항체를 제공하는 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 항체 의존적 세포 매개된 세포독성(ADCC)을 갖는 항-CD37 mAb를 제공하고자 했다.

[0015] 본 발명의 바탕이 되는 문제를 해결하기 위해, 사람 치료법에 유용한 키메라 및 사람화된 항-CD37 항체를 수득하기 위한 출발 항체로서 쥐 모노클로날 항-CD37 항체를 사용했다.

[0016] 제1 관점에서, 본 발명은 사람 CD37에 결합하고,

[0017] a) i. 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄; 및

[0018] ii. 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄에 의해 정의되는 쥐 모노클로날 항체로부터 유래되거나, 또는

[0019] b) 상기 a)에 정의된 항체와 동일한 사람 CD37 에피토프를 인식하거나 또는 이 에피토프와 유사하거나 또는 중첩되는 에피토프를 인식하는 비-사람 항체로부터 유래되는 것으로, 키메라 항체 또는 사람화된 항체인 항체 분자를 제공한다.

[0020] 다음 설명으로부터 알 수 있는 것처럼, 다른 항체, 즉 출발 항체로부터 "유래되는" 항체는 이하에 기술되는 출발 항체의 변형에 의해 제조된 항체를 의미한다.

[0021] 바람직한 양태에 따르면, 항체 분자는 상기 a)에 정의된 출발 항체로부터 유래된 키메라 항체 또는 사람화된 항체 분자이다. 관련 서열을 갖는 항체는 G28.1로 지칭하고 WO 2005/017148에 기술되어 있다.

[0022] 카테고리 b)의 출발 항체는 예컨대 G28.1처럼 3차 HLDA 워크샵에서 CD37 항원에 특성을 부여한 CD37-특이적 항

체 중에서 선택될 수 있고; 이러한 항체는 HD28, HH1, BI14, F97-3G6으로 표시되었다(Ling and MacLennan, 1987). 기술된 여타 CD37 특이적 항체로는 RFB-7, Y29/55, MB-1, M-B371, M-B372 및 IPO-24를 포함한다. 몰덴하우어(Moldenhauer, 2000) 및 슈바르츠-알바이즈(Schwartz-Albiez) 등(1988)에 따르면 상기 항체들은 모두 (G28.1을 포함해서) 동일한 또는 중합성 또는 유사한 CD37 에피토프를 인식한다. 슈바르츠-알바이즈 등(1988)은 상기 에피토프가 CD37의 탄수화물 모이어티 내에 위치한다고 시사한다. 이러한 항체들은 다수가 시중에서 입수될 수 있고, 그 예로는 HH1(SantaCruz), RFB-7(Biodesign), Y29/55(Biogenesis), M-B371(BD Biosciences), M-B372(SantaCruz) 및 IPO-24(AbCam)이다.

[0023] 여타 CD37 특이적 항체는 D-B3(Biosys), NMN46(Chemicon) 및 ICO-66(Bioprobe)이다. 항체가 G28.1과 동일한 항체를 인식하는지는 몰덴하우어(Moldenhauer) 등(1987) 및 몰덴하우어(2000)에 의해 기술된 바와 같은 교차 저해 방사면역분석법에 의해 또는 경쟁적 결합 분석법에 의해 측정될 수 있다.

[0024] 참고로, 경쟁적 결합은 CD37 단백질 또는 CD37 펩타이드로 또는 CD37 양성 세포로 코팅된 플레이트(Cell ELISA)를 사용하고 경쟁 후보 항체의 존재 하에 비오틴화된 항체의 결합물을 측정하는 ELISA로 측정할 수 있다. 경쟁 항체 또는 항체 유래의 단편의 존재 하에, 비오틴화된 G28.1(또는 동일한 에피토프를 인식하는 것으로 알려진 다른 항체)의 결합은 항체가 공유 에피토프를 인식하는 경우에 감소된다. G28.1 에피토프를 동정하기 위해, CD37 서열 유래의 펩타이드, 단편 또는 짧은 폴리펩타이드 또는 재조합 단백질은 합성하거나 생산할 수 있고, 상기 펩타이드/폴리펩타이드들에 대한 G28.1의 결합은 ELISA 분석으로 측정했다. 또한, 경쟁적 결합은 실시예에 기술된 바와 같이 FACS 분석으로 측정할 수 있다.

[0025] 상기 b)에 정의된 항체는 키메라 항체 또는 사람화된 항체 분자를 수득하기 위한 출발 항체로서, G28.1과 유사한 방식으로 사용될 수 있다.

[0026] 또한, 카테고리 b)의 출발 항체는 G28.1과 동일한 에피토프와 반응성인 항체를 수득하기 위한 면역화에 각각 관련 에피토프를 함유하는 펩타이드 또는 단백질 단편, 또는 이러한 펩타이드/단편을 암호화하는 DNA 분자를 사용하여 생산할 수도 있다.

[0027] 또한, 출발 항체 b)는 관련 에피토프를 보유하는 전체 세포를 이용한 면역화에 의해 수득될 수 있고, 이와 같이 수득된 하이브리도마 세포는 그 다음 분비된 항체의 경쟁적 결합에 대해 선별한다.

[0028] "항-CD37 항체 분자"란 용어는 항-CD37 항체 및 항-CD37 항체 단편뿐만 아니라 항체 분자를 보유한 접합체를 포함한다. 항체는, 본 발명의 목적 상, 키메라 모노클로날 항체 및 사람화된 모노클로날 항체를 포함한다. "항체 분자"와 상호교환가능하게 사용되기도 하는 "항체"란 용어는 완전한 면역글로불린(림프구에 의해 생산되고 예컨대 혈청에 존재하는 것), 하이브리도마 세포주에 의해 분비된 모노클로날 항체, 숙주 세포에서 재조합체 발현에 의해 생산되고 면역글로불린 또는 모노클로날 항체의 결합 특이성을 보유하는 폴리펩타이드, 및 결합 특이성을 보유하면서 변형이나 추가 가공에 의해 상기 항체로부터 유도된 분자를 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 한 양태에서, 항-CD37 항체 분자는

[0030] i) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄;

[0031] ii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄;

[0032] iii) 사람 기원인 불변성 중쇄 및 경쇄에 의해 정의되는 키메라 항체이다.

[0033] 키메라 마우스/사람 항체의 작제 및 생산은 당업계에 공지되어 있다(Boulianne et al., 1984). 일반적으로, 비-사람 항체의 가변 영역이 사람 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부(Fc)와 결합된다. 사람 불변 영역 DNA 서열은 다양한 사람 세포, 바람직하게는 무한증식성 B 세포로부터 공지된 절차에 따라 분리될 수 있다(Kabat et al., 1991; 및 WO 87/02671). 항체 분자는 CD37 항원 및 Fc 수용체에 대한 특이적 결합을 나타내는 한, 불변 영역 전체 또는 일부만을 함유할 수도 있다. 불변 영역의 종류와 길이의 선택은 효과기가 보체 고정화처럼 작용하는지 또는 항체 의존적 세포 매개된 독성이 필요한지에 따라, 그리고 항체 분자의 원하는 약리학적 성질에 따라 달라진다.

[0034] 특정 양태에 따르면, 본 발명의 항체 분자는 상기 a) 또는 b)에 정의된 비-사람 항체의 중쇄 가변 영역이 사람 중쇄 불변 영역 IgG1에 융합되고 a) 또는 b)에 정의된 비-사람 항체의 경쇄 가변 영역이 사람 경쇄 불변 영역 카파에 융합된, 키메라 CD37 특이적 항체이다.

[0035] 또 다른 양태에 따르면, 항체 분자는 서열번호 2에 제시된 중쇄 가변 영역이 서열번호 24에 제시된 서열(암호화

DNA 서열: 서열번호 23)을 보유한 IgG1 분자 또는 이로부터 유래된 돌연변이된 IgG1 분자와 융합되어 있고 서열번호 4에 제시된 경쇄 가변 영역이 서열번호 26에 제시된 사람 경쇄 불변 영역 카파(암호화 DNA 서열: 서열번호 25)와 융합되어 있는 키메라 CD37 특이적 항체이다.

[0036] a) 또는 b)에 정의된 비-사람 출발 항체를 키메라화하기 위한 다른 사람 불변 영역은 당업자라면 이용할 수 있는 것으로, 예컨대 IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE 또는 IgM(IgG1 대신) 또는 람다(카파 대신)이다. 또한, 불변 영역은 키메라일 수 있으며, 그 예로는 중쇄 IgG1/IgG2 또는 IgG1/IgG3 키메라이다.

[0037] 본 발명의 특정 양태에서, 항-CD37 항체 분자는

[0038] i. 서열번호 2에 제시된 가변 중쇄 내에 함유된 CDR 및

[0039] ii. 서열번호 4에 제시된 가변 경쇄 내에 함유된 CDR,

[0040] iii. 사람 항체로부터 유래되는, 상기 CDR들을 지지하는 프레임워크, 및

[0041] iv. 사람 항체 유래인 불변 중쇄 및 경쇄

[0042] 에 의해 특정되는 사람화된 항체이다.

[0043] 비-사람(예, 쥐, 래트 또는 토끼 항체) 항체의 사람화된 형태는 비-사람 면역글로불린으로부터 유래되는 최소의 서열을 함유하는 면역글로불린, 면역글로불린 쇄 또는 이의 단편(예, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 부분 서열(subsequence)을 보유하는 다른 항원 결합 분자)이다.

[0044] 사람화된 항체는 수용체 항체의 상보성 결정 영역(CDR) 유래의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력이 있는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비-사람 종(공여체 항체)의 CDR 유래의 잔기로 교체된 사람 면역글로불린(수용체 항체 유래)을 포함한다. 일부 경우에, 사람 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 대응하는 비-사람 잔기로 교체된다.

[0045] 본 발명의 사람화된 항체에서, a) 또는 b)에 정의된 비-사람 출발 항체의 CDR을 암호화하는 서열은 사람 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 각 유전자에 이식시켰다.

[0046] 모노클로날 항체의 "상보성 결정 영역"(CDR)은 문헌(Chothia and Lesk, 1987)과 함께 문헌(Kabat et al., 1991)에 따르면 특이적 항원 결합에 관여하는 아미노산 서열로 이해된다. 서열번호 2와 서열번호 4에 제시된 가변 영역의 서열로부터 CDR 서열은 통상적으로 서열 특징부에 대한 카바트(Kabat) 서열 데이터베이스를 조사하여 결정할 수 있다.

[0047] 사람화된 항체를 획득하기 위한 기술은 당업자에게 통용되는 것으로, 특히 US 5,225,539; US 6,548,640; 및 US 6,982,321에 기술되어 있다.

[0048] CDR 이식된 항체의 적당한 프레임워크 잔기는 쥐 잔기로 복귀되어 결합 친화도를 증가시킬 수 있다. 전술한 바와 같이, 당해 기술에 속하는 방법으로부터 당업자는 주어진 비-사람 항체로부터 CDR을 획득하고, 적당한 사람 면역글로불린 유전자를 선택하여 획득하고, 이러한 유전자에 상기 CDR을 이식시키며, 선택된 프레임워크 잔기를 변형시키고, 이러한 CDR 이식된 항체를 적당한 숙주 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현시키고, 획득되는 재조합 항체를 결합 친화도 및 특이성에 대해 시험하는 방법을 알고 있다.

[0049] 사람화된 항체를 획득하기 위해, 중쇄의 CDR과 경쇄의 CDR에 의해 형성된 항원 결합 부위는 설치류(쥐) 모노클로날 항체를 분비하는 세포의 DNA로부터 절제하여 사람 항체의 프레임워크를 암호화하는 DNA에 이식시킨다.

[0050] CDR 이식 대신에, 비-사람, 특히 쥐의 항-CD37 항체는 US 5,639,641에 기술된 바와 같이 표면에 노출된 잔기 외에 설치류 프레임워크는 변경시키지 않는, 소위 "재포장(resurfacing)" 기술로 사람화할 수 있다.

[0051] 다른 관점으로, 본 발명은 서열번호 6에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄와 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20 및 서열번호 22에 제시된 서열 중에서 선택되는 서열을 갖는 가변 경쇄를 보유하는 사람화된 항체에 관한 것이다.

[0052] 다른 관점으로, 본 발명은 서열번호 8에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄와 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20 및 서열번호 22에 제시된 서열 중에서 선택되는 서열을 갖는 가변 경쇄를 보유하는 사람화된 항체에 관한 것이다.

[0053] 다른 관점으로, 본 발명은 서열번호 10에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄와 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호

16, 서열번호 18, 서열번호 20 및 서열번호 22에 제시된 서열 중에서 선택되는 서열을 갖는 가변 경쇄를 보유하는 사람화된 항체에 관한 것이다.

[0054] 상기 정의된 사람화된 항체는 표 1에 제시된다.

[0055] 특정 양태에서, 사람화된 항체는 사람 중쇄 불변 영역 IgG1 및 사람 경쇄 불변 영역 카파를 보유한다. 앞에서 키메라 항체에 대해 설명한 바와 같이, 불변 영역은 다른 클래스 및 서브클래스에서 선택될 수 있다.

[0056] 특정 양태에서, 본 발명의 사람화된 항체 중의 사람 불변 중쇄 IgG1은 서열번호 24에 제시된 서열을 갖는 IgG1 분자 또는 이로부터 유도된 돌연변이된 IgG1 분자이고, 사람 경쇄 불변 영역 카파는 서열번호 26에 제시된 서열을 보유한다.

[0057] 또한, 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 서열목록에 제시된 아미노산 서열에 의해 정의된 항체의 변형체일 수 있다. 당업자라면, 통상의 기술을 이용하여 앞에서 정의된 항체의 기능적 변형체를 제조, 시험 및 이용할 수 있을 것이다. 그 예로는 CDR 및/또는 프레임워크 내의 적어도 하나의 위치가 변경된 변형 항체, 배선 서열과 편차가 있는 프레임워크 영역에 단일 아미노산 치환을 보유하는 변형 항체, 보존적 아미노산 치환이 있는 항체, 항체가 가변 쇄를 암호화하는 서열 목록에 제시된 DNA 분자와 엄중한 조건 하에서 하이브리드화하는 DNA 분자에 의해 암호화된 항체가 있다.

[0058] 각 아미노산의 성질이 제공된다면, 출발 항체의 전반적인 분자 구조를 보존하는 항체 변형체를 획득할 수 있는 적당한 치환을 수행할 수 있다. 아미노산 치환, 즉 "보존적 치환"은 예를 들어 각 아미노산의 극성, 하전, 용해성, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성에 유사성을 기준으로 하여 제조할 수 있다. 당업자에는 WO 2007/042309에 기술된 바와 같은 보편적인 아미노산 치환 및 이와 같이 변형된 항체를 획득하는 방법이 익숙하다. 유전자 암호와 재조합 및 합성 DNA 기술이 제공되면, 하나 이상의 보존적 아미노산 교환을 보유한 변형 항체를 암호화하는 DNA 분자는 관례적으로 설계할 수 있고 각 항체가 쉽게 획득될 수 있다.

[0059] 서열 목록에 제시된 가변 쇄에 의해 정의되는 항체와 비교할 때, 본 발명에 포함되는 항체 변형체는 CDR 영역 내의 서열 동일성이 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%이다. 또한, CDR 영역 내의 서열 유사성이 적어도 80%인 항체가 바람직하고, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95%인 항체이다. 바람직한 항체 변형체는 가변 영역 내의 서열 동일성이 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%인 것이다. 또한, 바람직한 항체는 가변 영역 내의 서열 유사성이 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95%이다.

[0060] 두 폴리펩타이드 서열 간의 "서열 동일성"은 서열 간에 동일한 아미노산의 백분율을 나타낸다. "서열 유사성"은 동일하거나 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산의 백분율을 나타낸다.

[0061] 또한, 변형체는 최적화의 출발점으로서 서열 목록에 제시된 정의된 서열을 갖는 항체를 사용하여, 하나 이상의 아미노산 잔기, 바람직하게는 하나 이상의 CDR 내의 아미노산 잔기를 다양화시키고, 획득되는 항체 변형체의 수집물을 개선된 성질의 변형체에 대해 선별함으로써 획득할 수 있다. 가변 경쇄의 CDR3, 가변 중쇄의 CDR3, 가변 경쇄의 CDR1 및/또는 가변 중쇄의 CDR2 내에 하나 이상의 아미노산 잔기의 다양화는 유용한 것으로 입증되었다. 다양화는 당업계에 공지된 방법, 예컨대 소위 TRIM 기술(WO 2007/042309에 언급됨)로 수행할 수 있다.

[0062] 다른 양태에서, 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 "친화도 성숙(affinity matured)" 항체이다.

[0063] "친화도 성숙" 항-CD37 항체는 서열목록에 제시된 서열을 갖는 항체에서 유도된 항-CD37 항체로, 각각의 미성숙 기원 항체에 비해 항원에 대한 친화도를 향상시키는 하나 이상의 CDR 내의 하나 이상의 변경을 보유한다. 이러한 항체 변이체를 생산하는 절차 중 하나는 파지 디스플레이를 포함한다(Hawkins et al., 1992; 및 Lowman et al., 1991). 간략히 설명하면, 여러 과가변 영역 부위(예컨대, 6 내지 7개 부위)를 변이시켜 각 부위에 가능한 모든 아미노산 치환을 생성시킨다. 이와 같이 생성된 항체 변이체는 사상 파지 입자로부터 각 입자 내에 포장된 M13의 유전자 III 산물과의 융합체로서 일가(monovalent) 방식으로 디스플레이된다. 파지 디스플레이된 돌연변이체는 그 다음 본 명세서에 개시된 바와 같이 생물학적 활성(예, 결합 친화도)에 대해 선별한다.

[0064] 친화도 성숙 항체는 또한 막스(Marks) 등, 1992(가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 도메인 서플링에 의한 친화도 성숙), 또는 바르바스(Barbas) 등, 1994; 시어(Shier) 등, 1995; 엘튼(Yelton) 등, 1995; 잭슨(Jackson) 등, 1995; 및 호킨스(Hawkins) 등, 1992(CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발)에 의해 기술된 방법 등으로 생산할 수도 있다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도

를 나타낼 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 "탈면역화된(de-immunized)" 항체이다.

- [0065] "탈면역화된" 항-CD37 항체는 서열목록에 제시된 서열을 보유하는 사람화된 항체 또는 키메라 항체 유래의 항체로, 각각의 기원인 비-탈사람화된 항체에 비해 항체의 면역원성을 감소시키는, 아미노산 서열의 하나 이상의 변경을 보유한다. 이러한 항체 변이체를 생산하는 절차 중 하나는 항체 분자의 T-세포 에피토프들의 동정과 제거를 수반한다(Baker and Jones, 2007). 제1 단계로, 항체 분자의 면역원성을 여러 방법, 예컨대 T-세포 에피토프의 시험관내 측정 또는 이러한 에피토프들의 컴퓨터 모의실험에 의한 예측 등으로 측정할 수 있으며, 이에 대해서는 문헌[Jones et al., 2004; Jones et al., 2005; Reche et al., 2004; Hertz et al., 2006]에 기술되어 있다. 일단 T-세포 에피토프 기능에 중요한 잔기가 동정되면, 면역원성을 제거하고 항체 활성을 유지하는 돌연변이를 실시할 수 있다(Jones et al., 2005; Tangri et al., 2005). 단백질에 돌연변이를 도입시키는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 그 예로는 중첩성 PCR 기술이 있다.
- [0066] 항체의 Fc 영역은 다수의 Fc 수용체와 상호작용하여 다수의 중요한 기능적 능력("효과기 기능"이라 지칭됨)을 제공하기 때문에, 항체는 특정 양태에 따르면 전체 길이의 항체이거나, 또는 항원의 관련 부 및 Fc 부에 대해 모두 특이적 결합을 나타내는 한 Fc 영역의 일부를 함유하는 항체이다. 불변 영역의 종류와 길이의 선택은 보체 고정화 또는 항체 의존적 세포 매개된 세포독성과 같은 효과기 기능이 필요한 특징인지의 여부, 그리고 원하는 항체 단백질의 약리학적 성질에 의존적이다.
- [0067] 본 발명의 한 양태에서, 항-CD37 항체는 Fc 영역 또는 이의 관련 구획을 보유하는 키메라 항체 또는 사람화된 항체로, 효과기 기능의 조절을 위해, 구체적으로 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 항체의 결합을 증강시켜 효과기 기능 ADCC를 증강시키도록 유전자조작된 것이다. Fc 영역의 유전자조작은 효과기 세포의 존재 하에 항체의 효과기 기능이 Fc 유전자조작되지 않은 모 항체보다 더욱 효과적하도록 매개한다. 한 양태에서, 이러한 항체 변형체는 모항체에 의해 매개되는 것보다 큰 ADCC의 매개를 나타낸다(이하에서, 별다른 언급이 없는 한, 항체 분자인 상황 또는 IgG 또는 Fc 영역인 상황에서 "모"라는 용어는 각각 변이된(유전자조작된) 분자가 유래되는 유전자조작되지 않은 항체 분자, Fc 영역 또는 IgG를 의미한다).
- [0068] Fc 영역의 다양한 변형에 대해서는 당해 기술분야에서 과학 논문과 특허 문서에 제안되어 있으며, 그 예로는 EP 0307434, WO 9304173, WO 9734631, WO 9744362, WO 9805787, WO 9943713, WO 9951642, WO 9958572, WO 02060919, WO 03074679, WO 2004016750, WO 2004029207, WO 2004063351, WO 2004074455, WO 2004035752, WO 2004099249, WO 2005077981, WO 2005092925, WO 2006019447, WO 2006031994, WO 2006047350, WO 2006053301, WO 2006088494 및 WO 2007041635가 있다.
- [0069] 바람직한 양태에서, 본 발명의 항체는 위치 332 및/또는 239 및/또는 236에 아미노산 치환이 있는 Fc 변형체이다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 항체는
- [0070] i) 위치 332의 단일 치환, 바람직하게는 I332E;
- [0071] ii) 위치 239 및 332에 치환의 조합, 바람직하게는 S239D/I332E;
- [0072] iii) 위치 236 및 332에 치환의 조합, 바람직하게는 G236A/I332E;
- [0073] iv) 위치 236, 239 및 332에 치환의 조합, 바람직하게는 G236A/S239D/I332E.
- [0074] 위에 정의된 치환은 예컨대 문헌[Lazar et al., 2006], WO 2004029207 및 WO 2007041635에 기술되어 있다.
- [0075] 본 발명의 항체에서 Fc 변형체는 이를 구성하는 아미노산 변형에 따라 정의된다. 따라서, 예컨대 I332E는 모 Fc 폴리펩타이드에 상대적으로 I332E 치환을 보유하는 Fc 변형체이다. 이와 마찬가지로, S239D/I332E는 치환 S239D 및 I332E를 보유하는 Fc 변형체를 나타내고, S239D/I332E/G236A는 모 Fc 폴리펩타이드에 상대적으로 S239D, I332E 및 G236A 치환을 보유하는 Fc 변형체를 나타낸다.
- [0076] 넘버링은 EU 항체의 넘버링을 의미하는 EU 넘버링 체계(Kabat et al., 1991)를 따른다(Edelman et al., 1969). 당업자는 이러한 관례가 면역글로불린 서열의 특정 영역에서의 비순차적 넘버링으로 이루어져 면역글로불린 계열의 보존 위치들에 대한 표준적 언급을 할 수 있게 한다는 것을 알고 있을 것이다.
- [0077] 앞에서 정의된 항체들에서, 치환 위치 236, 239 및 332는 각각 서열번호 24에 기술된 IgG1 중쇄의 위치 119, 122 및 215에 대응한다(서열번호 28, 32, 36 및 40에 제시된 항체 A2, A4, B2 및 B4의 중쇄의 전체 길이 서열에서, 치환된 아미노산은 위치 235, 238 및 331이다).
- [0078] 특정 양태에서 본 발명의 Fc 변형체는 사람 IgG 서열을 기반으로 하여, 사람 IgG 서열은 다른 서열이 비교되는

"기본" 서열로 사용된다. 본 발명의 항체를 위해, 유전자조작된 Fc 영역은 바람직하게는 IgG, 특히 IgG1이지만, 여타 면역글로불린 클래스, 예컨대 IgA, IgE, IgD, IgM, 또는 2 이상의 면역글로불린 클래스의 키메라 버전(예, IgG2/IgG1) 등으로부터 유래되는 IgG2 또는 변형체 서열일 수 있다. 본 발명의 Fc 변형체는 하나의 모 IgG의 상황에서 유전자조작되지만, 변형체는 다른 제2의 모 IgG의 상황에서 유전자조작되거나 또는 다른 제2 모 IgG의 상황으로 "전이"될 수 있다. 이는 일반적으로 제1 IgG와 제2 IgG 사이의 서열이나 구조의 상동성을 기초로 한, 제1 IgG와 제2 IgG 간에 "등가" 또는 "대응하는" 잔기 및 치환을 측정하여 수행한다. 상동성을 수립하기 위해서 약술된 제1 IgG의 아미노산 서열을 제2 IgG 서열과 직접 비교한다. 당업계에 알려진 하나 이상의 상동성 정렬 프로그램을 사용하고 정렬을 유지하기 위해 필요한 삽입과 결실을 허용(즉, 임의의 결실 및 삽입을 통한 보존적 잔기의 제거는 피하면서)하면서 서열을 정렬한 후, 제1 Fc 변형체의 1차 서열에 존재하는 특정 아미노산에 등가인 잔기가 규정된다. 등가 또는 대응 잔기가 어떻게 측정되는지에 관계없이, 그리고 IgG가 제조되는 모 IgG의 본질(identity)에 관계없이, 운반되어야 하는 것은 본 발명에 사용된 Fc 변형체가 Fc 변형체와 유의적인 서열 또는 구조의 상동성이 있는 임의의 제2 모 IgG 내로 유전자조작될 수 있다는 것이다. 즉, 예컨대 모 항체가 사람 IgG1인 변형 항체가 생산된다면, 전술한 방법 또는 등가의 잔기를 측정하기 위한 여타 방법을 사용해서, 변형 항체는 사람 IgG2 모항체, 사람 IgA 모항체 등에서 유전자조작될 수 있다(WO 2007041635 참조).

[0079] 본 발명의 항체는 샘플이 CD20 mRNA의 낮은 발현 수준에 비해 CD37 mRNA 발현의 높은 수준을 나타내는 만성 림프구성 백혈병에서와 같이 CD37 발현 수준이 CD20 발현 수준보다 높은 질환에서 CD20의 표적화보다 유리할 수 있는 항원 CD37을 표적으로 삼는다.

[0080] 본 발명의 항체는 라모스(Ramos) 세포에서의 ADCC 활성, 전혈에서 정상 B 세포 고갈 및 라모스 버킷 림프종 세포 고갈 측면에서 등록된 항-CD20 항체인 리툽시마브보다 우수한 것으로 입증되었다. 본 발명의 실험들에서 관찰할 수 있듯이, 본 발명의 항체(Fc 유전자조작되지 않은 것 및 Fc 유전자조작된 것)는 리툽시마브보다 우수한 B 세포 고갈 활성을 나타낸다. 돌연변이된 Fc 영역을 보유한 항체는 리툽시마브와 비교했을 때 약 10배 증가된 B 세포 고갈 활성을 나타낸다(도 11B).

[0081] 본 발명의 대표적인 CD37 항체는 가교결합없이 강력한 아포토시스촉진 활성을 나타내고, 이러한 점에서 상기 성질을 갖는 항체는 가교결합없이 아포토시스를 나타내지 않는 항-CD37 SMIP Tru16.4보다 우수하다(Zhao et al., 2007). 가교결합 부재 하에 아포토시스의 유도는, Fc 유전자조작되거나 Fc 유전자조작되지 않은 본 발명의 항체에서 관찰될 수 있는 것으로, 생체내 가교결합체의 부재 시에 유리하고(예컨대, Fc_v 수용체를 수용하는 효과기 세포) 또는 표적 항원 CD37이 저밀도인 경우(예, CD37의 발현 수준이 낮은 종양 세포)에 유리하다. 가교결합없이 아포토시스를 유도하는 항체는 여전히 세포사를 유발할 수 있는데 반해, 가교결합에 의존적인 항체는 그렇지 않다.

[0082] 또 다른 관점에서, 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 본 발명에 따른 사람화된 또는 키메라 CD37 특이적 항체로부터 유래되는 항체 단편이다. 항체 단편, 예컨대 Fab 단편을 획득하기 위해, 분해는 파파인 사용 등과 같은 통상의 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 파파인 분해의 예는 WO 94/29348 및 US 4,342,566에 기술되어 있다. 항체의 파파인 분해는 일반적으로 각각 단일 항원 결합 부위를 보유하는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 소위 Fab 단편과 나머지 Fc 단편을 생산한다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 보유하며 항원을 가교결합시킬 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생산한다.

[0083] 또한, 항체의 분해로 획득되는 Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인(CH₁)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역 유래의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH₁ 도메인의 카르복시 말단에 추가 잔기를 함유한다는 점에서 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 본 명세서에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하고 있는 Fab'를 나타낸 것이다. F(ab')₂ 항체 단편은 힌지 시스테인을 사이에 보유하는 Fab' 단편의 쌍으로 생산되었다. 또한, 항체 단편은 각각의 암호화 DNA 단편을 생산하는 분자생물학 방법으로 획득할 수도 있다.

[0084] 항체 분자는 일반적으로 2개의 경쇄/중쇄 쌍으로 이루어진 사량체일 수 있으나, 경쇄/중쇄 쌍으로 이루어진 이량체성, 예컨대 Fab 또는 Fv 단편일 수도 있고, 또는 단량체성 단일쇄 항체(scFv; Johnson and Bird, 1991), 미니바디(minibody) 또는 디아바디(diabody)일 수 있다.

[0085] 또한, 항-CD37 항체 분자는 집합체 형태, 즉 세포독성체, 특히 종양 세포의 세포독성(예, 아포토시스 또는 유사 분열 정제)을 유도하는 세포독성체에 화학적으로 커플링된 항체 분자일 수 있다. 정상적인 약리학적 제거 기전의 결과로, 약물 집합체("면역집합체")에 이용된 항체는 제한된 양만이 표적 세포에 접촉하여 결합한다.

따라서, 접합체에 이용된 세포독성제는 치료 효과를 끌어내기에 충분한 세포 사멸이 일어나도록 고도로 세포독성이어야 한다. 이러한 세포독성제의 예로는, US2004/0241174에 기술된 것처럼, 탁산(예, WO 01/38318 및 WO 03/097625 참조), DNA 알킬화제(예, CC-1065 유사체), 안트라사이클린, 튜불리신 유사체, 듀오카마이신 유사체, 독소루비신, 오리스타틴 E, 리신 A 독소 및 반응성 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 세포독성제가 포함된다(예컨대, Sasse et al., 2000; Suzawa et al., 2000; Ichimura et al., 1991; Francisco et al., 2003; US 5,475,092; US 6,340,701; US 6,372,738; US 6,436,931; US 2001/0036923; US 2004/0001838; US 2003/0199519; 및 WO 01/49698 참조).

[0086] 바람직한 양태에서, 세포독성제는 메이탄신의 유도체인 메이탄시노이드(CAS 35846538)로, 당업계에서 공지된 메이탄시노이드는 메이탄신, 메이탄시놀, 메이탄시놀의 C-3 에스테르 및 여타 메이탄시놀 유사체 및 유도체를 포함한다(예, US 5,208,020 및 US 6,441,163 참조).

[0087] 항-CD37 항체 면역접합체는 항-FAP 면역접합체에 대해 WO 2007/077173에 기술된 것처럼 설계 및 합성될 수 있다.

[0088] 추가 양태로, 본 발명의 항-CD37 분자는 방사능 표지되어 방사면역접합체를 형성할 수 있고, 이는 항-CD37 항체 MB-1에 대해 제안된 시도이다(Buchsbaum et al., 1992, 상기 참조). 유익한 방사선 성질을 갖는 방사핵종은 당업계에 공지되어 있고, 그 예로는 인-32, 스트론튬-89, 이트륨-90, 요오드-131, 사마리움-153, 에르븀-169, 이터븀-175, 레늄-188이 있으며, 이들은 Mab에 성공적으로 안정하게 커플링되었다. 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 US 6,241,961에 기술된 것처럼 당업계에 공지된 직접 표지화 또는 간접 표지화 방법을 사용해 다양한 방사핵종으로 표지화될 수 있다. 본 발명에 유용한 신규 방사능표지된 항체 접합체를 제조하고 적용하기 위한 기술에 대한 검토는 문헌[Goldenberg and Sharkey, 2007]에 제시되어 있다.

[0089] 본 발명의 항체 분자는 Fc 유전자조작 여부에 관계없이 이중특이성, 즉 2가지 다른 표적에 결합하는 항체 분자일 수 있고, 한 표적은 CD37에 결합하고 다른 하나는 T 세포에 의해 발현된 표면 항원, 예컨대 CD3, CD16 및 CD56에서 선택되는 것에 결합한다.

[0090] 또한, 본 발명은 본 발명의 키메라 또는 사람화된 항-CD37 항체 분자를 암호화하는 DNA 분자에 관한 것이다. 본 발명의 항체 분자의 가변 중쇄를 암호화하는 서열은 서열번호 1, 서열번호 5, 서열번호 7 및 서열번호 9에 제시되어 있다. 본 발명의 항체 분자의 가변 경쇄를 암호화하는 서열은 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15, 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21에 제시된 것이다.

[0091] 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 핵산은 표준 방법에 의해 화학적 및 효소적(PCR 증폭)으로 합성될 수 있다. 먼저, 합성 유전자를 생산하는데 사용할 수 있는 적당한 올리고뉴클레오타이드를 당업계에 공지된 방법(예, Gait, 1984)으로 합성할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드로부터 합성 유전자를 제조하는 방법은 당업계에 알려져 있다(예, Stemmer et al., 1995; Ye et al., 1992; Hayden et Mandecki, 1988; Frank et al., 1987).

[0092] 본 발명의 DNA 분자는 서열목록에 제시된 DNA 분자를 포함하지만, 이에 국한되지 않는다. 따라서, 본 발명은 또한 WO 2007/042309에 정의된 바와 같은 고 염도 결합 및 세척 조건 하에서 서열목록에 제시된 DNA 분자에 하이브리드화하는 핵산 분자에 관한 것으로, 이러한 핵산 분자는 서열목록에 제시된 서열에 의해 암호화된 항체와 동등하거나 보다 우수한 성질을 나타내는 항체 또는 이의 기능성 단편을 암호화한다. 바람직한 분자(mRNA 관점에서)는 본 명세서에 기술된 DNA 분자 중 하나와 적어도 75% 또는 80%(바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%)의 상동성 또는 서열 동일성을 나타내는 것이다.

[0093] 본 발명의 범위에 속하는 다른 클래스의 DNA 변형체는 이것이 암호화하는 폴리펩타이드와 관련지어 정의할 수 있다. 이 DNA 분자는 서열면에서 서열목록에 제시된 것과 차이가 있지만, 유전자 암호의 축퇴성으로 인해 아미노산 서열이 동일한 항체를 암호화한다. 참고로, 진핵생물 세포에서의 항체 발현을 고려하여, 서열목록에 제시된 DNA 서열을 진핵생물 세포의 코돈 용법에 부합하도록 설계했다. 항체를 이.콜라이에서 발현시켜야 한다면, 이 서열은 이.콜라이 코돈 용법에 부합하도록 변화시킬 수 있다. 본 발명의 DNA 분자의 변형체는 예컨대 WO 2007/042309에 기술된 여러 다른 방식으로 삭제할 수 있다.

[0094] 본 발명의 제조항 항-CD37 항체 분자를 생산하기 위해서는 전체 길이의 경쇄 및 중쇄 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA 분자를, 전사 및 해독 조절 서열에 작동가능하게 결합되도록 발현 벡터에 삽입한다. 본 발명의 항체 제조를 위해, 당업자는 당업계에 공지된 다양한 발현계, 예컨대 문헌[Kipriyanow and Le Gall, 2004]에서 논의된 발현계 중에서 선택할 수 있다.

[0095] 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 코스미드, EBV 유래 에피솜 등을 포함한다. 발현 벡터와 발현 조절

서열은 숙주 세포와 융화성인 것으로 선택한다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 다른 벡터에 삽입시킬 수 있다. 특정 양태에 따르면, 두 DNA 서열은 동일한 발현 벡터에 삽입된다. 편리한 벡터는 전술한 바와 같이 임의의 VH 또는 VL 서열이 쉽게 삽입되고 발현될 수 있도록 유전자조작된 적당한 제한 부위를 보유하는, 기능적으로 완전한 사람 CH 또는 CL 면역글로불린 서열을 암호화하는 것이다. 불변쇄는 보통 항체 경쇄인 경우 카파 또는 람다이고, 항체 중쇄인 경우에는 임의의 IgG 이소타입(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 또는 다른 면역글로불린, 예컨대 대립형질 변형체일 수 있으나, 이에 국한되지는 않는다.

[0096]

또한, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체 쇄의 분비를 촉진하는 시그널 펩타이드를 암호화할 수 있다. 항체 쇄를 암호화하는 DNA는 시그널 펩타이드가 성숙 항체 쇄 DNA의 아미노산 말단에 프레임내 결합되도록, 벡터에 클로닝될 수 있다. 시그널 펩타이드는 면역글로불린 시그널 펩타이드 또는 면역글로불린의 단백질 유래의 이중 펩타이드일 수 있다. 또는, 항체 쇄를 암호화하는 DNA 서열은 이미 시그널 펩타이드 서열을 함유할 수 있다.

[0097]

항체 쇄를 암호화하는 DNA 서열 외에, 재조합 발현 벡터는 프로모터, 인핸서, 종결 시그널 및 폴리아데닐화 시그널, 및 숙주 세포에서 항체 쇄의 발현을 조절하는 여타 발현 조절 인자를 보유한다. 프로모터 서열의 예(포유동물 세포에서의 발현인 경우)로는 CMV(예컨대 CMV 시미안 바이러스 40(SV40))(예컨대, SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(AdMLP)), 폴리오마 유래의 프로모터 및/또는 인핸서, 및 강한 포유동물 프로모터, 예컨대 천연 면역글로불린 및 액틴의 프로모터가 있다. 폴리아데닐화 시그널의 예로는 BGH polyA, SV40 후기 또는 조기 polyA이고; 대안적으로, 면역글로불린 유전자의 3' UTR 등이 사용될 수 있다.

[0098]

또한, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예, 복제 오리진) 및 선택성 마커 유전자를 보유할 수 있다. 항-CD37 항체의 중쇄 또는 이의 항원결합부 및/또는 경쇄 또는 이의 항원결합부를 암호화하는 핵산 분자, 및 이러한 DNA 분자를 함유하는 벡터는 당업계에 공지된 형질감염 방법, 예컨대 리포솜 매개된 형질감염, 다가양이온 매개된 형질감염, 원형질 융합, 미량주사, 인산칼슘 침전법, 전기침투법 또는 바이러스 벡터에 의한 전이 등에 따라 세균 세포 또는 고등 진핵생물 세포, 예컨대 포유동물 세포 등의 숙주 세포로 도입시킬 수 있다.

[0099]

중쇄 및 경쇄를 암호화하는 DNA 분자는 숙주 세포, 바람직하게는 포유동물 세포를 공동형질감염시키는 2개의 벡터에 존재하는 것이 바람직하다.

[0100]

발현용 숙주로 이용할 수 있는 포유동물 세포주는 당업계에 공지되어 있고, 특히 중국 햄스터 난소(CHO, CHO-DG44) 세포, NSO, SP2/0 세포, HeLa 세포, 어린 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 사람 암종 세포(예, Hep G2), A549 세포, 3T3 세포 또는 이러한 임의의 세포주의 유도체/자손을 포함한다. 사람, 마우스, 래트, 원숭이 및 설치류 세포주를 포함하되, 이에 국한되지 않는 다른 포유동물 세포, 또는 효모, 곤충 및 식물 세포를 포함하되, 이에 국한되지 않는 다른 진핵생물 세포, 또는 세균과 같은 원핵생물 세포가 사용될 수 있다. 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 숙주 세포에서 항체 분자의 발현을 허용하기에 충분한 시간 기간 동안 숙주 세포를 배양하여 생산한다.

[0101]

항체 분자는 분비된 폴리펩타이드로서 배양 배지로부터 회수하는 것이 바람직하고, 만일 분비 시그널없이 발현된다면 숙주 세포 용해물로부터 회수할 수도 있다. 항체는 실질적으로 균일한 제조물이 수득되는 한가지 방법으로 재조합 단백질 및 숙주 세포 단백질에 사용되는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 항체 분자를 정제하는 것이 필요하다. 예로서, 본 발명의 항-CD37 항체 분자를 수득하는데 유용한 현 기술 수준의 정제 방법은 제1 단계로서 세포 배지 또는 용해물로부터 세포 및/또는 미립자형 세포 파편의 분리를 포함한다. 그 다음, 항체는 오염물인 용해성 단백질, 폴리펩타이드 및 핵산으로부터, 예컨대 면역친화성 컬럼 또는 이온교환 컬럼에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 세파텍스 크로마토그래피, 실리카 크로마토그래피 또는 양이온 교환 수지 크로마토그래피에 의해 정제된다. 항-CD37 항체 분자 제조물을 수득하기 위한 방법의 마지막 단계로, 정제된 항체 분자는 이하에 기술되는 치료학적 응용을 위해 건조, 예컨대 동결건조할 수 있다. 또 다른 관점으로, 본 발명은 활성 성분으로서 본 발명의 항-CD37 항체 분자를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0102]

치료용으로 사용하기 위해, 항-CD37 항체는 동물 또는 사람에게 용이하게 투여하기에 적당한 약제학적 조성물에 혼입시킨다. 항-CD37 항체 분자의 일반적인 제형은 항-CD37 항체 분자를 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여 동결건조 제형 또는 다른 건조 제형이나, 수용액 또는 수성이나 비수성 현탁액 형태로 제조할 수 있다. 담체, 부형제, 개질제 또는 안정화제는 사용된 투약량 및 농도에서 비독성이다. 그 예로는 인산염, 시트르산염, 아세트산염 및 기타 무기산 또는 유기산 및 이들의 염과 같은 완충 시스템; 아스코르브산

및 메티오닌과 같은 항산화제; 보존제(예, 데카테실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류, 과당류 또는 다당류 및 기타 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 슈크로스, 트레할로스, 텍스트린 또는 텍스트란; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 당알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물(예, Zn-단백질 착물); 및/또는 이온성 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™(폴리소르베이트), PLURONICS™ 또는 지방산 에스테르, 지방산 에테르 또는 당 에스테르가 있다. 또한, 에탄올 또는 프로판올과 같은 유기 용매도 항체 제형에 첨가될 수 있다. 또한, 부형제는 방출 개질 또는 흡수 개질 기능이 있을 수 있다.

[0103] 항-CD37 항체 분자는 또한 건조(동결건조, 분무건조, 분무동결건조, 근임계 또는 초임계 기체에 의한 건조, 또는 진공 건조, 공기 건조), 침전 또는 결정화되거나, 또는 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴과 폴리(메틸메타크릴레이트) 등을 이용한 계면 중합 또는 코아서베이션 기술 등에 의해 준비된 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달제(예컨대, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에 또는 마크로에멀전에 포집되거나, 또는 pcmc 기술(단백질 코팅된 마이크로결정) 등에 의해 담체 또는 표면에 침전되거나 고정화될 수 있다. 이러한 기술에 대해서는 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Hendrickson R. Ed]에 개시되어 있다.

[0104] 당연히, 생체내 투여용으로 사용할 제형은 멸균되어야 하고; 멸균은 통상의 기술, 예컨대 멸균 여과 막을 통한 여과 등에 의해 달성될 수 있다.

[0105] 항-CD37 항체는 소위 고농도 액체 제형(HCLF)이 되도록 농도를 증가시키는 것이 유용할 수 있다; 이러한 HCLF의 다양한 생산 방법은 기술되어 있다.

[0106] 항-CD37 항체 분자는 또한 지속방출 제제에 함유될 수 있다. 이러한 제제는 소수성 또는 친수성 중합체의 고체, 반고체 또는 액체 기질(matrices)을 포함하고, 필름, 스틱 또는 마이크로캡슐과 같은 성형 물품의 형태일 수도 있고, 적용 기구를 통해 적용될 수도 있다. 지속방출 기질의 예로는 폴리에스테르, 하이드로겔(예, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 슈크로스 아세테이트 부티레이트), 또는 폴리(비닐알콜), 폴리락타이드(US 3,773,919), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT™(락트산-글리콜산 공중합체와 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사성 마이크로구), 및 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일이 넘는 넘도록 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 하이드로겔은 이보다 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 항체는 오랜 시간 동안 체내에 남아 있을 때, 37°C에서 수분에 대한 노출의 결과로 변성 또는 응집하여, 생물학적 활성을 상실하거나 아마도 면역원성이 변화하게 된다. 안정화를 위해 수반 기구에 따라 적당한 전략이 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 기구가 티오-디설파이드 상호변환을 통한 분자간 S-S 결합 형성에 의한 것으로 밝혀지면, 안정화는 설프하이드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조(예컨대, WO 89/011297에 기술), 적당한 첨가제를 이용한 수분 함량의 조절 및 특이적 중합체 기질 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.

[0107] 또한, 본 발명의 항-CD37 항체 분자용으로 사용될 수 있는 제형은 US 7,060,268 및 US 6,991,790에 기술되어 있다.

[0108] CD37 항체 분자는 다른 적용 형태, 예컨대, 분산액, 현탁액 또는 리포솜, 정제, 캡슐, 분말, 스프레이, 투과 증강 기구를 존재 또는 부재 하의 경피 또는 피내 패치 또는 크림, 웨이퍼, 비축, 협축 또는 폐축 제형에 혼입될 수 있고, 또는 이식 세포에 의해 생산되거나, 또는 유전자 요법 후 개체 자신의 세포에 의해 생산될 수도 있다.

[0109] 항-CD37 항체 분자는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 메틸 또는 에틸 기, 또는 탄수화물 기와 같은 화학적 기에 의해 유도체화될 수 있다. 이러한 기들은 혈청 반감기의 증가 또는 조직 결합의 증가와 같이 항체의 생물학적 특징을 향상시키는데 사용될 수 있다.

[0110] 바람직한 적용 방식은 비경구, 주입 또는 주사(정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 피내)이지만, 흡입, 경피, 비내, 협축, 경구와 같은 다른 적용 방식도 이용할 수 있다.

[0111] 질환의 예방이나 치료를 위한 항체의 적당한 투약량은 치료할 질환의 종류, 질환의 중증도 및 경과, 예방용 또는 치료용과 같은 항체의 투여 목적, 이전 치료법, 환자의 임상 이력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 판단에

따라 달라질 것이다. 항체는 1회 또는 일련의 치료 동안 환자에게 투여되는 것이 적당하다.

- [0112] 질환의 종류 및 증증도에 따라, 환자에게 투여할 초기 후보 투약량은 예컨대 1회 이상의 분리 투여에 의해서든 지 또는 연속 주입에 의해서든지간에 약 0.01 $\mu\text{g/kg}$ 내지 40mg/kg(예, 0.1 내지 20mg/kg)이다. 병태에 따라 수 일 동안 또는 그 이상 동안 반복 투여 시, 질환 증상의 원하는 억제가 나타날 때까지 치료를 지속한다. 하지만, 다른 투약 요법이 유용할 수도 있다. 이러한 치료법의 진행은 통상의 기술 및 분석법에 의해, 예컨대 B 세포 고 갈 정도의 측정(예컨대, 흐름세포측정)에 의해 쉽게 모니터될 수 있다.
- [0113] 투여할 항체의 "치료학적 유효량"은 질환 또는 장애를 예방, 경감 또는 치료하는데 필요한 최소량이다.
- [0114] 본 발명의 항-CD37 항체 분자 및 이를 함유하는 약제학적 조성물은 표면에 CD37을 발현시켜 암성 또는 자가면역 /염증성 질환을 유발하는 B 세포의 고갈에 유용하다.
- [0115] 제1 관점에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 암, 특히 임의의 CD37 양성 악성종양의 치료에 유용하다.
- [0116] B 세포 악성종양으로는 B 세포 림프종(예컨대, 다양한 형태의 호지킨스 질환, B 세포 비호지킨 림프종(NHL) 및 관련 림프종(예, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(림프형질세포 림프종 또는 면역종이라고도 불림) 또는 중추신 경계 림프종), 백혈병(예, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL; B 세포 만성 림프구성 백 혈병 BCLL이라고도 불림) 및 골수종(예, 다발성 골수종)이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 다른 B 세포 악성종양으로는, 소형 림프구성 림프종, B 세포 전림프구성 백혈병, 림프형질세포 림프종, 비장 주변 구역 림프 종, 혈질세포 골수종, 골의 고립 형질세포종, 골의 형질세포종, 점막 관련 림프구성 조직(MALT)의 림프질의 주 변 구역 B 세포 림프종, 결절 주변 구역 B 세포 림프종, 소포성 림프종, 외투세포 림프종, 미만성 큰 B 세포 림 프종, 종격(흉선) 큰 B 세포 림프종, 혈관내 큰 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종, 버킷 림프종/백혈병, 그레 이존 림프종, 악성능 불명의 B 세포 증식, 림프종양 육아종증 및 이식후 림프증식성 장애가 포함된다.
- [0117] 다른 관점으로, 항-CD37 항체를 함유하는 약제학적 조성물은 이들의 병리에 B 세포를 수반하는 자가면역 및 염 증성 질환의 치료에 유용하다.
- [0118] 이러한 질환으로는, 관절염, 류마티스성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 골관절염, 다발연골염, 건선관절염, 다공증, 피부염, 다발근육염/피부근염, 봉입체 근염, 염증성 근염, 독성 상피 괴사, 진신 공포증, 경화증, CREST 증후군, 염증성 장질환과 관련된 반응, 크론병, 궤양성 결장염, 호흡곤란 증후군, 성인 호흡곤란증후군 (ARDS), 수막염, 뇌염, 포도막염, 결장염, 사구체신염, 알레르기성 병태, 습진, 천식, T 세포 침윤 및 만성 염 증 반응을 수반하는 병태, 아테롬성경화증, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍증, 전신홍반루푸스(SLE), 아급 성 피부 홍반 루푸스, 원관상 루푸스, 루푸스 척수염, 루푸스 뇌염, 소아 초기 당뇨병, 다발경화증, 알레르기성 뇌골수염, 시각신경 척수염, 류마티스열, 시든햄 무도병, 사이토킨 및 T 림프구 매개성 급성 및 지연형 과민과 관련 있는 면역반응, 결핵, 사르코이드증, 육아종증, 예컨대 베게너 육아종증 및 초그-스트라우스 질환, 과립구 결핍증, 혈관염(예컨대, 과민 혈관염/맥관염, ANCA 및 류마티스성 혈관염), 재생불량 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 빈혈, 면역 용혈성 빈혈, 예컨대 자가면역 용혈성 빈혈(AIHA), 악성 빈혈, 진정적혈구계 무형성증(PRCA), 제 VIII 인자 결핍증, A형 혈우병, 자가면역 호중구백혈구감소증, 범혈구감소증, 백혈구감소증, 백혈구 혈구누출을 수반하는 질환, 중추신경계(CNS) 염증성 장애, 다발 기관 손상 증후군, 중증근육무력증, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 항인지질 항체 증후군, 알레르기 신경염, 베체트 질환, 케슬먼 증후군, 군파스쳐 증후군, 람버트-이튼 근육무력증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐슨-존슨 증후군, 실질 기관 이식 거부, 이식편대숙주 질환(GVHD), 수포성 유천포창, 천포창, 자가면역성 다발성 내분비장애, 혈청인자음성 척추 관절증, 라이터 질환, 근육강직 증후군, 거대세포 동맥염, 면역복합체 신염, IgA 신장병증, IgM 다발성신경병증 또는 IgM 매개신경병증, 특발성 혈소판감소성 자반증(ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반증(TTP), 헤노흐-췌라인 자반증, 자가면역 혈구관감소증, 고환 및 난소의 자가면역 질환, 예컨대 자가면역 고환염 및 난소염, 원발성 갑 상선기능저하증; 자가면역 내부분 질환, 예컨대 자가면역 갑상선염, 만성 갑상선염(하시모토 갑상선염), 아급성 갑상선염, 특발성 갑상선기능저하증, 에디슨씨병, 그레이브병, 자가면역 다분비선 증후군(또는 다분비선 내분비 질환 증후군), 제I형 당뇨병(인슐린 의존적 진성당뇨병(IDDM)이라고도 불림) 및 시헌 증후군; 자가면역성 간염, 림프구성 사이질 폐렴(HIV), 폐쇄성 세기관지염(비이식성) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 대혈관 혈관염(예컨대 류마티스성 다발성근육통 및 거대세포(다카야스) 동맥염), 중간혈관 혈관염(예, 가와사키병 및 결절성다발성동 맥염), 결절성 다발성동맥염(PAN) 강직성 척추염, 버거씨병(IgA 신경병증), 급진성 사구체신염, 원발성 담즙 성 경화, 비열대성 스프루(글루텐 장병증), 저온형글로불린혈증, 간염 관련 저온형글로불린혈증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 만성 동맥 질환, 가족성지중해열, 현미경적 다발성맥관염, 코간 증후군, 위스코트-알드리치 증후 군 및 폐쇄성 혈전혈관염(WO 2007/014278 참조)을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

- [0119] 치료할 장애에 따라, 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 단독으로 또는 하나 이상의 추가 치료제, 특히 암세포의 혈관형성, 시그널 전달 경로 또는 유사분열 체크포인트를 저해하는 치료학적 활성 화합물 또는 DNA 손상제 또는 튜블린 결합제 중에서 선택되는 치료제와 함께 사용될 수 있다.
- [0120] 추가 치료제는 동시에, 경우에 따라 동일한 약제학적 제제의 성분으로서, 또는 항-CD37 항체분자의 투여 전이나 후에 투여될 수 있다.
- [0121] 특정 양태에 따르면, 추가 치료제는 EGFR 계열, VEGFR 계열, IGF-1R, 인슐린 수용체, 오로라A, 오로라B, PLK 및 PI3 키나제, FGFR, PDGFR, Raf, KSP 또는 PDK1의 저해제 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 저해제일 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0122] 추가 치료제의 추가 예로는 CDK, Akt, Src, Bcr-Abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, 헛지호그(hedgehog) 길항제, JAK/STAT 저해제, Mek, mTor, NFkappaB, 프로테아좀, Rho, Wnt 시그널링 또는 Notch 시그널링 저해제 또는 유비퀴틴화 경로 저해제가 있다.
- [0123] 오로라 저해제의 예는 PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 및 ENMD-2076이나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0124] PLK 저해제의 한 예는 GSK-461364이다.
- [0125] raf 저해제의 예는 BAY-73-4506 (VEGFR 저해제), PLX-4032, RAF-265 (VEGFR 저해제), 소라페니브(VEGFR 저해제), XL-281 및 Nevavar(VEGFR 저해제)이다.
- [0126] KSP 저해제의 예는 이스피네시브(ispinesib), ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK-246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355 및 EMD-534085이다.
- [0127] src 및/또는 bcr-abl 저해제의 예는 다사티니브(dasatinib), AZD-0530, 보수티니브(bosutinib), XL-228 (IGF-1R 저해제), 닐로티니브(nilotinib) (PDGFR 및 cKit 저해제), 이마티니브(cKit 저해제), NS-187, KX2-391, AP-24534 (EGFR, FGFR, Tie2, Flt3의 저해제), KM-80 및 LS-104 (Flt3, Jak2의 저해제)이다.
- [0128] PDK1 저해제의 한 예는 AR-12이다.
- [0129] Rho 저해제의 한 예는 BA-210이다.
- [0130] PI3 키나제 저해제의 예에는 PX-866, PX-867, BEZ-235(mTor 저해제), XL-147 및 XL-765 (mTor 저해제), BGT-226, CDC-0941이 있다.
- [0131] cMet 또는 HGF 저해제의 예는 XL-184(VEGFR, cKit, Flt3의 저해제), PF-2341066, MK-2461, XL-880(VEGFR의 저해제), MGCD-265(VEGFR, Ron, Tie2의 저해제), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMab, CGEN-241, BMS-777607, JNJ-38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060, 및 E-7050이다.
- [0132] c-Myc 저해제의 예는 CX-3543이다.
- [0133] Flt3 저해제의 예는 AC-220(cKit 및 PDGFR의 저해제), KW-2449, LS-104 (bcr-abl 및 Jak2의 저해제), MC-2002, SB-1317, 레스타우르티니브(lestaurtinib) (VEGFR, PDGFR, PKC의 저해제), TG-101348(JAK2의 저해제), XL-999(cKit, FGFR, PDGFR 및 VEGFR의 저해제), 수니티니브(sunitinib)(PDGFR, VEGFR 및 cKit의 저해제), 및 탄두티니브(tandutinib)(PDGFR 및 cKit의 저해제)이다.
- [0134] HSP90 저해제의 예는 타네스피마이신(tanespimycin), 알베스피마이신(alvespimycin), IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUY-922, CNF-2024, 및 SNX-5422이다.
- [0135] JAK/STAT 저해제의 예는 CYT-997(튜블린과도 상호작용함), TG-101348(Flt3 저해제) 및 XL-019이다.
- [0136] Mek 저해제는 ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119 및 XL-518이다.
- [0137] mTor 저해제의 예는 템시롤리무스(temsirolimus), 데포롤리무스(deforolimus)(VEGF 저해제로도 작용함), 에머롤리무스(everolimus)(VEGF 저해제), XL-765 (PI3 키나제 저해제이기도 함) 및 BEZ-235(PI3 키나제 저해제이기도 함)이다.

- [0138] Akt 저해제는 페리포신(perifosine), GSK-690693, RX-0201 및 트리시리빈(triciribine)이다.
- [0139] cKit 저해제의 예는 마시티니브(masitinib), OSI-930(VEGFR 저해제로도 작용함), AC-220 (Flt3 및 PDGFR의 저해제이기도 함), 탄두티니브(tandutinib) (Flt3 및 PDGFR의 저해제이기도 함), 악시티니브(axitinib)(VEGFR 및 PDGFR의 저해제이기도 함), 수니티니브(또한 Flt3, PDGFR, VEGFR의 저해제), 및 XL-820 (또한 VEGFR- 및 PDGFR 저해제로도 작용함), 이마티니브(또한 bcr-abl 저해제), 닐로티니브(bcr-abl 및 PDGFR의 저해제이기도 함)이다.
- [0140] 헛지호그 길항제의 예는 IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926 및 XL-139이다.
- [0141] CDK 저해제의 예는 셀리시클리브(seliciclib), AT-7519, P-276, ZK-CDK (VEGFR2 및 PDGFR을 저해하기도 함), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, PHA-848125 및 SCH-727965이다.
- [0142] 프로테아좀 저해제의 예는 보르테조미브(bortezomib), 카필조미브(carfilzomib), 및 NPI-0052 (NFkappaB의 저해제이기도 함)이다.
- [0143] 프로테아좀 저해제/NFkappaB 경로 저해제의 예는 보르테조미브, 카필조미브, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680 및 SPC-839이다.
- [0144] 유비퀴틴화 경로 저해제의 한 예는 HBX-41108이다.
- [0145] 항혈관형성제의 예는 FGFR, PDGFR 및 VEGF(R)의 저해제, 및 탈리도미드(thalidomide)이며, 이러한 제제는 제한 없이 베바시주마브(bevacizumab), 모테사니브, CDP-791, SU-14813, 텔라티니브, KRN-951, ZK-CDK(CDK의 저해제이기도 함), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiD, 탈리도미드, CC-4047, 레날리도미드, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, 브리바니브, 세디라니브, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530(또한 Flt3의 저해제임), 수니티니브(또한 cKit 및 Flt3 저해제임), 악시티니브(또한 cKit의 저해제임), 레스타우르티니브(lestaurtinib) (Flt3 및 PKC의 저해제이기도 함), 바탈라니브(vatalanib), 탄두티니브(Flt3 및 cKit의 저해제이기도 함), 파조파니브, PF-337210, 아플리베르셉트(aflibercept), E-7080, CHIR-258, 소라페니브 토실레이트(sorafenib tosylate) (또한, Raf 저해제), 반데타니브, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (또한 EGFR 및 Her2 저해제), BAY-57-9352 (또한 Raf 저해제), BAY-73-4506 (또한 Raf 저해제), XL-880 (또한 cMet 저해제), XL-647 (또한 EGFR 및 EphB4 저해제), XL-820 (또한 cKit 저해제), 닐로티니브(또한 cKit 및 bcr-abl 저해제), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, 도비티니브, CY-2401401 및 ENMD-2976 중에서 선택된다.
- [0146] 추가 치료제는 또한 EGFR 저해제 중에서 선택될 수 있고, 이 저해제는 소분자 EGFR 저해제 또는 항-EGFR 항체일 수 있다. 항-EGFR 항체의 예는 제한없이 세툽시마브, 파니투무마브, 니모투주마브, 잘루투무마브이고; 소분자 EGFR 저해제의 예는 제피티니브, 에를로티니브 및 반데타니브(또한 VEGFR 저해제)이다. EGFR 조절제의 다른 예는 EGF 융합 독소이다.
- [0147] 본 발명의 항-CD37 항체 분자와 함께 사용하기에 유용한 추가 EGFR 및/또는 Her2 저해제는 라파티니브, 트라스투주마브, 퍼투주마브, XL-647, 네라티니브, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAb-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788(또한 VEGFR의 저해제), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab, TAK-285, AZD-4769이다.
- [0148] 추가 약물은 또한 IGF-1R 및 인슐린 수용체 경로를 표적화하는 제제 중에서 선택될 수 있다. 이러한 제제로는 IGF-1R에 결합하는 항체(예, CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIB-022, SCH-717454, rhu Mab IGF1R) 및 IGF1-R의 키나제 도메인을 표적화하는 신규 화학적 실체(예, OSI-906 또는 BMS-554417, XL-228, BMS-754807)이다.
- [0149] 본 발명의 항-CD37 항체 분자와 함께 치료법에 병용되는 것이 유리할 수 있는 여타 제제는 CD20을 표적화하는 분자, 예컨대 CD20 특이적 항체, 예컨대 리툽시마브, LY-2469298, 옥크렐리주마브(ocrelizumab), MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (=R7159), XmAb-0367, 오파투무마브(ofatumumab), 방사표지된 CD20 항체, 예컨대 토시투무마브(tositumumab) 및 이브리투모마브 티우제탄(ibritumomab tiuxetan) 또는 다른 CD20 유도 단백질, 예컨대 SMIP Tru015, PRO-131921, FBT-A05, veltuzumab, R-7159이다.
- [0150] CD37 항체는 백혈구에서 발현되는 다른 표면 항원의 저해제들, 특히 항체 또는 항체 유사 분자와 병용될 수 있고, 그 예로는 항-CD2(시플리주마브), 항-CD4(자놀리주마브), 항-CD19(MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), 항-CD22(에프라투주마브), 항-CD23(리밀리시마브), 항-CD30(이라투무마브), 항-CD32B(MGA-321), 항-CD38(HuMax-CD38), 항-CD40(SGN40), 항-CD52(알람투주마브), 항-CD80(갈릭시마브)이 있다. 본 발명의 항체는

또한 다른 CD37 길항제, 예컨대 TRU-016과 병용될 수 있다.

[0151] CD37 항체와 병용될 여타 제제는 면역독소, 예컨대 BL-22(항-CD22 면역독소), 이노투주마브 오조가미신(항-CD23 항체-칼리케아미신 접합체), RFT5.dgA (항-CD25 리신 독소 A쇄), SGN-35(항-CD30-오리스타틴 E 접합체), 및 켄투주마브 오조가미신(항-CD33 칼리케아미신 접합체), MDX-1411(항-CD70 접합체), 또는 방사표지된 항체, 예컨대 ⁹⁰Y-에프라투주마브(항-CD22 방사면역접합체)이다.

[0152] 또한, 항-CD37 항체는 면역조절제, 제제, 예컨대 아픔토시스를 유도하거나 시그널 전달 경로를 개질시키는 항체, 예컨대 TRAIL 수용체 조절제인 마파투무마브(mapatumumab) (TRAIL-1 수용체 효능제), 렉사투무마브(lexatumumab) (TRAIL-2 수용체 효능제), 티가투주마브(tigatuzumab), 아포마브(Apomab), AMG-951 및 AMG-655; 항-HLA-DR 항체(예, 1D09C3), 항-CD74, 과골세포 분화 인자 리간드 저해제(예, 데노수마브(denosumab)), BAFF 길항제(예, AMG-623a) 또는 Toll-유사 수용체 효능제(예, TLR-4 또는 TLR-9)와 병용될 수 있다.

[0153] 본 발명의 항-CD37 항체 분자와 병용될 수 있는 다른 약물은 호르몬, 호르몬 유사체 및 항호르몬제(예, 타목시펜, 토레미펜, 탈록시펜, 폴베스트란트, 메제스트롤 아세테이트, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 사이프로테론 아세테이트, 피나스테라이드, 부세렐린 아세테이트, 플루드로코르티손, 플루옥시메스테론, 메드옥시프로게스테론, 하이드록시프로게스테론 카프로에이트, 디에틸스틸베스트롤, 테스토스테론 프로피오네이트, 프루옥시메스테론/등가물, 옥트레오타이드, 아르족시펜, 파시레오타이드, 바프레오타이드, 아드레노코르티코스테로이드/길항제, 프레드니손, 덱사메타손, 아이노글루테티미드), 아로마타제 저해제(예, 아나스트로졸, 레트로졸, 리아로졸, 엑제메스탄, 아타메스탄, 포르메스탄), LHRH 효능제 및 길항제(예, 고세렐린 아세테이트, 류프롤라이드, 아바렐릭스, 세트로렐릭스, 데스로렐린, 트리메트렉세이트, 페메스텍시드, 피리미딘 유사체, 예컨대 5-플루오로우라실, 플루오로데옥시우리딘, 카팩시타빈, 텍시타빈, 넬라라빈, 5-아자시타딘 및 켄시타빈, 퓨린 및 아데노신 유사체, 예컨대 머캅토피린, 티오구아닌, 아자티오프린, 클라드리빈 및 켄토스타틴, 사이타라빈, 플루다라빈, 클로파라빈); 항종양 항생제(예, 안트라사이클린, 예컨대 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신 및 이다루비신, 미토마이신-C, 블레오마이신 닥티노마이신, 플리카마이신, 스피리카마이신, 악티노마이신 D, 미톡산트론, 미톡산트론이다루비신, 픽산트론, 스트렙토조신, 아피디콜린); 백금 유도체(예, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 로바플라틴, 사트라플라틴); 알킬화제(예, 에스트라무스틴, 세무스틴, 메클로에타민, 멜팔란, 클로람부실, 부설판, 다카바진, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 하이드록시우레아, 테모졸로미드, 니트로소우레아, 예컨대 카무스틴 및 로무스틴, 티오테파); 항유사분열제(예, 빈카 알칼로이드, 예컨대 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈, 빈플루닌 및 빈크리스틴; 및 탁산, 예컨대 파클리탁셀, 도세탁셀 및 이들의 포물레이션, 라로탁셀; 시모탁셀 및 에포티올론, 예컨대 익사베필론, 파투필론, ZK-EPO); 토포이소머라제 저해제(예, 에피도도실로톡신, 예컨대 에토포사이드 및 에토포포스, 테니포사이드, 암사크린, 토포테칸, 이리노테칸, 바녹산트론, 캄토테신) 및 다수의 화학치료제, 예컨대 리틴산 유도체, 아미포스틴, 아나글레라이드, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터루킨-2, 프로카바진, N-메틸하이드라진, 미토탄 및 포르피머, 백사로텐, 셀레콕시브, 에틸렌민/메틸-멜라민, 트리에틸멜라민, 트리에틸렌 티오포스포아미드, 헥사메틸멜라민, 및 효소 L-아스파라기나제, L-아르기나제 및 메트로니다졸, 미소니다졸, 데스메틸미소니다졸, 피모니다졸, 에타니다졸, 니모라졸, RSU 1069, E09, RB 6145, SR4233, 니코틴아미드, 5-브로모데옥시우리딘, 5-요오도데옥시우리딘, 브로모데옥시시타딘, 에리트로하이드록시노닐-아데닌, 안트라센디온, GRN-163L(경쟁적 텔로머라제 주형 길항제), SDX-101(PPAR 효능제), 탈라보스타트(DPP 저해제), 포로데신(PNP 저해제), 아타시셉트(TNF 계열 구성원인 BlyS 및 APRIL을 표적화하는 용해성 수용체), TNF알파 중화제(Enbrel, Humira, Remicade), XL-844 (CHK1/2 저해제), VNP-40101M (DNA 알킬화제), SPC-2996(안티센스 bc12 저해제), 오바토클락스(obatoclox)(bc12 저해제), 엔자스타우린(PKC 베타 조절제), 보리니스테트(HDAC 저해제), 로미덱신(HDAC 저해제), AT-101(Bcl-2/Bcl-xL 저해제), 폴리테덱신(다작용성 덱시캅타이드), SL-11047(폴리아민 대사 조절제) 중에서 선택되나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0154] 특정 양태에서, 항-CD37 항체 분자는 "CHOP"(사이클로포스파미드, 옥소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손의 배합물)과 함께 적용된다.

[0155] 본 발명의 항-CD37 항체 분자는 또한 다른 치료법, 예컨대 수술, 방사요법, 내분비 요법, 생물학적 반응 조절제, 온열요법 및 냉동요법, 임의의 부작용을 약화시키는 제제(예, 항구토제), G-CSF, GM-CSF, 감광제, 예컨대 헤마토포르피린 유도체, Photofrin®, 벤조포르피린 유도체, Npe6, 주석 에티오포르피린, 페오보라이드-박테리오클로로필-a, 나프탈로시아닌, 프탈로시아닌, 아연 프탈로시아닌 등과 함께 사용될 수 있다.

[0156] 모노클로날 항체는 정교한 항원 특이성을 나타내고 종종 사람 표적 항원과만 반응하고 동물 중 유래의 동족 단

백질과는 반응하지 않는다. 치료학적 항체의 개발을 돕기 위해서는 적당한 동물 모델을 이용한 생체내 독성 및 약동학적 거동의 평가가 필요하다. 가능한 1가지 생체내 모델은 내인성 표적 항원이 이의 사람 동족체("녹아웃/녹인(knock-out/knock-in) 마우스"로 교체된 유전자도입 마우스이다. 구체적으로, 치료학적 항-CD37 항체 개발을 위해, 쥐 CD37은 사람 CD37 유전자로 교체될 수 있다. 이는 사람 CD37 유전자의 암호화 게놈 서열을 미해독 서열 옆에 인접시킨 표적 벡터를 작제함으로써 달성할 수 있다. 이러한 표적 벡터는 마우스 ES 세포를 이용한 상동 재조합에 사용할 수 있다. 사람 37 발현에 대해 동형접합성인 유전자도입 동물은, 예컨대 항체 적용 후 말초 B 세포의 수를 모니터링함으로써, 사람 CD37에 대해 지향성인 항체의 약동학적 효과를 평가하는데 사용될 수 있다. 또는, 상기 마우스는 정맥내 적용 후 사람 CD37 특이적 항체의 잠재적인 독성 효과를 조사하는데 사용될 수 있다.

[0157] 모노클로날 항체의 동물 교차반응성이 부족한 경우의 다른 가능성은 소위 대응 항체의 생산이다. 대응 항체는 약동학적 효과 및 독성 효과의 조사에 유용하고 관련이 있는 동물 종, 예컨대 마우스 또는 사이노몰거스 원숭이의 동종 단백질과 반응하는 항체이다. CD37인 경우에는 머카크 CD37 또는 마우스 CD37에 각각 특이적인 모노클로날 항체를 생산한다. 이론적으로, 이러한 대응 항체는 개발 항체와 유사한 결합 및 기능적 성질을 보유해야 한다. 이러한 성질은 결합, FACS 스캐차드 분석, ADCC 및 아포토시스 분석 등을 위한 표적 세포로서 머카크 또는 마우스 CD37 발현 세포를 이용하는 분석 시스템을 사용하여 조사할 수 있다. 궁극적으로, 대응 항체는 시험관내 머카크 또는 마우스 혈액 중의 B 세포 고갈 활성을 통해 선택할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0158] 도 1: FACS 경쟁 분석으로 측정시, CD37 항원을 특이적으로 인식하는 키메라 항체 A0
 도 2: FACS로 측정된, 세포 CD37 항원에 대한 사람화된 A0의 결합성
 도 3: FACS로 측정된, 세포 CD37 항원에 대한 사람화된 A0의 결합성
 도 4: FACS 스캐차드 분석으로 측정된, 세포 CD37 항원에 대한 사람화된 A0의 친화도
 도 5: 라모스 세포에서의 사람화된 A0의 ADCC 활성
 도 6: 라모스 세포에서의 사람화된 A0의 아포토시스촉진 활성
 도 7: 라모스 세포에서의 Fc 유전자조작된 mAb A0의 ADCC 활성
 도 8: 라모스 세포에서의 Fc 유전자조작된 AAb B0의 ADCC 활성
 도 9: mAb A0 및 B0의 아포토시스촉진 활성
 도 10: Fc 유전자조작된 mAb A0의 아포토시스촉진 활성
 도 11a: 전혈 분석에서 리톡시마브와 비교한 Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2의 정상 사람 B 세포의 고갈
 도 11b: 리톡시마브와 비교한 Fc 유전자조작 후의 항체의 우수한 B 세포 고갈 활성
 도 11c: 전혈 분석에서 T 세포 및 단핵구를 고갈시키지 않는 항체 A2 및 B2
 도 12: 리톡시마브와 비교한 Fc 유전자조작 후의 우수한 ADCC 활성
 도 13: 전혈 분석에서 리톡시마브와 비교한 Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2의 라모스 버킷 림프종 세포 고갈
 도 14: Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2에 의한 누드 마우스의 라모스 이종이식편 종양의 생체내 종양 성장 저해
 도 15: 다발성 골수종 세포에서의 CD37 발현
 도 16: 다발성 골수종 세포에 대한 항체 A2 및 B2의 ADCC 활성
 도 17: 환자 유래의 CLL 세포에 대한 항체 A2 및 B2의 아포토시스촉진 활성

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0159] 실시예 1

[0160] 키메라 및 사람화된 항-CD37 항체의 생산

- [0161] a) 키메라 항체 A0의 생산
- [0162] 서열번호 2 및 서열번호 4에 제시된 가변 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 기초로 하여, 포유동물 세포에 최적화된 코돈 용법을 적용하고(GeneArt, Regensburg, Germany), 5' 말단에 HindIII 및 3' 말단에 BamHI 클로닝 부위를 부가하여 대응 DNA 서열을 합성한다. 합성된 DNA 분자는 HindIII 및 BamHI으로 분해하고, 수득되는 DNA 단편(서열번호 1 및 서열번호 3 + 제한효소 부위)을, 사람 IgG1 불변 영역 및 사람 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 24 및 26)을 각각 암호화하는 pcDNA3.1 기반의 발현 벡터에 클로닝한다. EndoFree 플라스미드 제조물(Qiagen)을 준비하고 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 공급자의 프로토콜에 따라 각각 1mg/L의 농도로 사용하여 HEK293 프리스타일 세포(Invitrogen)를 공동형질감염시킨다. 72시간 후, 상청액을 수거하고, IgG 농도를 ELISA로 측정한다. 수득되는 키메라 항-CD37 항체(A0으로 표시)는 변형 단백질 A 컬럼(GE Healthcare)에서 정제하고 시트르산염 완충액으로 용출시킨 뒤, PBS에서 투석한다.
- [0163] b) 사람화된 키메라 항체 A0의 생산
- [0164] a)에서 수득한 키메라 mAb A0의 사람화는 US 5,225,539; US 6,548,640; US 6,982,321에 기술된 바와 같은 CDR 이식 시도를 이용해서 수행한다.
- [0165] mAb A0 VL 도메인의 구조 모델을 만들기 위해, 구조 주형은 브록헤른 내셔널 레버레이토리의 단백질 데이터 뱅크(PDB)에서 선택한다. 쥐 모노클로날 항체 엔트리 "1KB5" 유래의 VL 도메인은 88% 서열 동일성/81% 유사성 및 2.5Å 해상능을 갖는 것을 선택한다. mAb A0 VH 도메인인 경우에는, 90% 서열 동일성 및 91% 유사성을 지닌 동일한 마우스 모노클로날 항체 구조 "1KB5"를 주요 모델링 주형으로 선택한다. 사람 컨센서스 프레임워크에 대한 최고 적합도는 사람 V카파1(hVK1) 및 사람 VH1(hVH1) 타입인 것으로 밝혀졌다. 대안적 디자인으로, 가장 안정한 사람 컨센서스 도메인 hVK3 및 hVH3에 대한 이식편을 선택한다. 이식을 위해, mAb A0_VL 및 mAb A0_VH 모델을 사람 컨센서스 도메인 모델 hVK1, hVK3, hVH1A 및 hVH3과 조합하고, Fv 모델로 조합 생산한다. 루프 이식은 쥐 mAb A0 CDR 영역을 사람 항체 프레임워크에 매립하여 수행하고 사람화된쇄 작제물의 DNA 분자를 합성한다.
- [0166] 각각의 사람화된 가변 영역을 합성하고 면역글로불린 발현 벡터에 클로닝한 뒤, 상기 a)에서 설명한 바와 같은 HEK 293 프리스타일 발현계(Invitrogen)에서 이하 표 1에 제시된 중쇄 및 경쇄 서열의 조합으로 일시 발현시키고, 단백질 A 컬럼에서 정제한다.

표 1

실시에에 사용된 키메라 및 사람화된 항-CD37 항체의
가변 중쇄 및 경쇄의 서열

항체	중쇄 서열번호 아미노산/DNA	경쇄 서열번호 아미노산/DNA
A (=A0)	서열번호 2/1	서열번호 4/3
B	서열번호 6/5	서열번호 12/11
C	서열번호 6/5	서열번호 14/13
D	서열번호 6/5	서열번호 16/15
H	서열번호 8/7	서열번호 18/17
I	서열번호 8/7	서열번호 20/19
J	서열번호 8/7	서열번호 22/21
K	서열번호 10/9	서열번호 18/17
L	서열번호 10/9	서열번호 20/19
M	서열번호 10/9	서열번호 22/21

- [0167]
- [0168] c) Fc 유전자조작된 키메라 및 사람화된 항-CD37 항체의 생산

[0169] Fc 돌연변이체의 생산은 문헌[Lazar et al., 2006]에 기술된 바와 같이 수행한다. 수득되는 Fc 유전자조작된 중쇄 서열은 발현 벡터 pAD-CMV1(EP 393 438에 기술됨)에 도입시켜, 경쇄 암호화 서열을 함유하는 플라스미드와 함께 CHO-DG44 세포를 공동형질감염시킨다. 형질감염 후 5 내지 7일째 세포 배양 배지로부터 항체를 수거하고, 단백질 A 크로마토그래피로 정제하여 시트르산염 완충액으로 용출시킨 뒤 PBS에서 투석한다. 샘플의 단백질 함량은 Protein A HPLC로 측정하고, 내독소 함량은 Kinetic-QCL Kinetic Chromogenic Assay(Lonza)를 통해 측정한다. 샘플의 단량체 함량은 HP-SEC로 측정하고, 그 결과 기능 검사에 사용된 모든 샘플은 >95%의 단량체 함량

을 나타낸다.

표 2

키메릭 및 사람화된 항-CD37 항체의 Fc 돌연변이(컬럼 II)와 가변 중쇄 및 경쇄(컬럼 III 및 IV)의 서열
(항체 A0, B0, C0 등은 표 1의 항체 A, B, C 등과 동일하다)

중쇄 및 경쇄의 전체 길이 서열은 컬럼 V와 VI에 열거한다
(컬럼 V에서 *로 표시된 서열은 암호화 DNA에서 컬럼 II에 대응하는 치환(들)과 각각의 돌연변이(들)를 보유하도록 변형된, 서열번호 24 및 23(야생형 서열)의 IgG1 서열을 의미한다).

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc 치환(들) (Kabat 넘버링)	서열번호 v 중쇄 아미노산/ DNA	서열번호 v 경쇄 아미노산/ DNA	서열번호 완전한 중쇄 아미노산/ DNA	서열번호 완전한 경쇄 아미노산/ DNA
A0	-	서열번호 2/1	서열번호 4/3	24/23에 융합된 2/1	26/25에 융합된 4/3
A1	I332E	서열번호 2/1	서열번호 4/3	24*/23*에 융합된 2/1	26/25에 융합된 4/3
A2	S239D/I332E	서열번호 2/1	서열번호 4/3	28/27	30/29
A3	I332E/G236A	서열번호 2/1	서열번호 4/3	24*/23*에 융합된 2/1	26/25에 융합된 4/3
A4	S239D/I332E/G236A	서열번호 2/1	서열번호 4/3	32/31	34/33
B0	-	서열번호 6/5	서열번호 12/11	24/23에 융합된 6/5	26/25에 융합된 12/11
B1	I332E	서열번호 6/5	서열번호 12/11	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 12/11
B2	S239D/I332E	서열번호 6/5	서열번호 12/11	36/35	38/37
B3	I332E/G236A	서열번호 6/5	서열번호 12/11	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 12/11
B4	S239D/I332E/G236A	서열번호 6/5	서열번호 12/11	40/39	42/41
C0	-	서열번호 6/5	서열번호 14/13	24/23에 융합된 6/5	26/25에 융합된 14/13
C1	I332E	서열번호 6/5	서열번호 14/13	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 14/13
C2	S239D/I332E	서열번호 6/5	서열번호 14/13	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 14/13
C3	I332E/G236A	서열번호 6/5	서열번호 14/13	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 14/13
C4	S239D/I332E/G236A	서열번호 6/5	서열번호 14/13	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 14/13

[0170]

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc 치환(들) (Kabat 넘버링)	서열번호 v 중쇄 아미노산/ DNA	서열번호 v 경쇄 아미노산/ DNA	서열번호 완전한 중쇄 아미노산/ DNA	서열번호 완전한 경쇄 아미노산/ DNA
D0	-	서열번호 6/5	서열번호 16/15	24/23에 융합된 6/5	26/25에 융합된 16/15
D1	I332E	서열번호 6/5	서열번호 16/15	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 16/15
D2	S239D/I332E	서열번호 6/5	서열번호 16/15	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 16/15
D3	I332E/G236A	서열번호 6/5	서열번호 16/15	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 16/15
D4	S239D/I332E/G236A	서열번호 6/5	서열번호 16/15	24*/23*에 융합된 6/5	26/25에 융합된 16/15
H0	-	서열번호 8/7	서열번호 18/17	24/23에 융합된 8/7	26/25에 융합된 18/17
H1	I332E	서열번호 8/7	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 18/17
H2	S239D/I332E	서열번호 8/7	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 18/17
H3	I332E/G236A	서열번호 8/7	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 18/17
H4	S239D/I332E/G236A	서열번호 8/7	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 18/17
I-0	-	서열번호 8/7	서열번호 20/19	24/23에 융합된 8/7	26/25에 융합된 20/19
I-1	I332E	서열번호 8/7	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 20/19
I-2	S239D/I332E	서열번호 8/7	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 20/19
I-3	I332E/G236A	서열번호 8/7	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 20/19
I-4	S239D/I332E/G236A	서열번호 8/7	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 20/19
J0	-	서열번호 8/7	서열번호 22/21	24/23에 융합된 8/7	26/25에 융합된 22/21
J1	I332E	서열번호 8/7	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 22/21
J2	S239D/I332E	서열번호 8/7	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 22/21
J3	I332E/G236A	서열번호 8/7	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 22/21
J4	S239D/I332E/G236A	서열번호 8/7	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 8/7	26/25에 융합된 22/21

[0171]

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc 치환(들) (Kabat 넘버링)	서열번호 v 중쇄 아미노산/ DNA	서열번호 v 경쇄 아미노산/ DNA	서열번호 완전한 중쇄 아미노산/ DNA	서열번호 완전한 경쇄 아미노산/ DNA
K0	-	서열번호 10/9	서열번호 18/17	24/23에 융합된 10/9	26/25에 융합된 18/17
K1	I332E	서열번호 10/9	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 18/17
K2	S239D/I332E	서열번호 10/9	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 18/17
K3	I332E/G236A	서열번호 10/9	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 18/17
K4	S239D/I332E/G236A	서열번호 10/9	서열번호 18/17	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 18/17
L0	-	서열번호 10/9	서열번호 20/19	24/23에 융합된 10/9	26/25에 융합된 20/19
L1	I332E	서열번호 10/9	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 20/19
L2	S239D/I332E	서열번호 10/9	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 20/19
L3	I332E/G236A	서열번호 10/9	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 20/19
L4	S239D/I332E/G236A	서열번호 10/9	서열번호 20/19	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 20/19
M0	-	서열번호 10/9	서열번호 22/21	24/23에 융합된 10/9	26/25에 융합된 22/21
M1	I332E	서열번호 10/9	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 22/21
M2	S239D/I332E	서열번호 10/9	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 22/21
M3	I332E/G236A	서열번호 10/9	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 22/21
M4	S239D/I332E/G236A	서열번호 10/9	서열번호 22/21	24*/23*에 융합된 10/9	26/25에 융합된 22/21

[0172]

[0173]

실시예 2

[0174]

키메릭 mAb A0은 CD37 항원을 특이적으로 인식한다

[0175]

세포의 CD37에 대한 MAb A0의 특이성은 FACS 경쟁분석으로 라모스 Burkitt 림프종 세포(ATCC #CRL-1596)에 대해 시험한다. 세포는 배양 배지로 10% 열불활성화된 소태아 혈청, 12.5mM HEPES, 1mM 소듐 피루베이트, 1% MEM 비필수 아미노산이 보충된 RPMI-1640 + GlutaMAX를 이용하여 조직 배양 플라스크(175cm²)에서 증식시킨다. 세포는 가슴 대기 중의 5% CO₂, 37°C에서 3일 동안 3x10⁵ 세포/ml의 초기 밀도로 배양된다. 이 배양물은 매주 2 내지 3회 새 배양 배지와 1:6의 비율로 계대배양하여 3x10⁵ 및 1.8x10⁶/ml 사이의 세포 농도로 유지시킨다. FACS 경쟁 분석시, 피코에리트린(PE)이 직접 표지화된 CD37 특이적 mAb HH1(Santa Cruz)은 1μg/ml의 농도로 사용한다. 항체는 미표지된 경쟁 항체 A0과 제시된 물 비로 4°C에서 10분 동안 예비항온처리한다. 그 다음, 1x10⁵ 라모스 세포를 얼음 상에서 항체 혼합물과 30분 동안 항온처리한다. 그 후, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 2회 세척하고, FACS 완충액에 재현탁시킨 후, BD FACS Canto에서 측정한다. 이 분석의 결과는 도 1에 제시한다. 20배 물 과량의 대조용 사람 IgG1 항체(Sigma IgG1 카파)의 첨가는 라모스 세포의 평균 형광 강도(MFI)를 크게 감소시키지 않는다. 미표지화된 HH1 항체 또는 A0 항체의 20배 물 과량의 첨가는 직접 표지된 HH1 항체의 결합을 거의 완전하게 파괴시켰다. 이것은 A0 항체와 HH1 항체가 라모스 세포 상의 동일한 또는 유사한 에피토프를 인식하여 세포성 CD37 항원에 대한 결합에 있어서 경쟁성임을 시사한다.

[0176]

실시예 3

- [0177] 세포의 CD37 항원에 대한 사람화된 mAb A0의 결합
- [0178] 사람화된 A0의 세포성 CD37 항원에 대한 결합성은 FACS 분석으로 시험한다. 항체는 제시된 농도로 라모스 세포에 첨가하고 4℃에서 30분 동안 결합하게 둔다. 그 다음, 결합된 항체는 PE 표지화된 염소-항-사람 IgG 항체(Sigma)로 검출하고, 세포는 PBS로 2회 세척한 다음, 세포를 FACS 완충액에 재현탁시키고, BD FACS Canto에서 FACS로 분석한다. 결과는 도 2와 3에 제시한다(각각 항체 A, B, C, D, I 또는 A, H, I, J, K, L 및 M; 표 1 참조). 여러 사람화된 A0은 모 항체 A0처럼 라모스 세포에 대한 결합성이 유사하여, 사람화가 세포성 CD37 항원에 대한 결합을 감소시키지 않음을 시사한다.
- [0179] 실시예 4
- [0180] 사람화된 키메릭 mAb A0의 FACS 스캐차드 분석
- [0181] 사람화된 항체 A0 (B, C, D, H, I 및 K로 표시됨; 표 1 참조)의 세포성 CD37 항체에 대한 친화도는 다른 문헌(Brockhoff et al., 1994)에 기술된 FACS 스캐차드 분석으로 측정한다. 간단히 설명하면, 첫번째 웰(80 μ l)에서 100 내지 400nM로 시작한 뒤, 11개의 희석 단계(1:2, 40 + 40 μ l)로 희석되는 항체 희석물을 96웰 플레이트에 준비한다. mAb 희석물 50 μ l를 FACS 튜브에 첨가하고, 150 μ l 세포(0.8×10^6 /ml = 1.2×10^5 세포/튜브)를 각 FACS 튜브에 첨가한다. 세포는 천천히 혼합하고 얼음에서 1시간 동안 항온처리한다. 그 다음, 50 μ l FITC 접합된 2차 항체(농도 15 μ g/ml; 마우스 mAb 항-hu IgG 모든 서브클래스, Zymed 05-4211)를 첨가하고, 혼합한 뒤, 얼음 위에서 30분간 항온처리한다. 그 다음, 0.02% 산을 함유하는 4ml PBS(pH 7.2)를 첨가하고, 세포를 펠릿화한 뒤, 300 μ l PBS(pH 7.2)에 재현탁시키고, BD FACS Canto를 이용하여 FACS 분석으로 처리한다. 모든 실험 단계는 얼음 물에서 수행하고, 모든 항체 희석물은 PBS/0.5% BSA + 0.02% 산으로 제조한다. FACS 보정은 Quantum FITC MESF(Premix) High Level Beads(Bangs Laboratories)로 수행한다. 모든 샘플은 같은 FACS 파라미터를 사용하여 측정한다. 결합된 IgG 대 유리 IgG의 비율은 다른 항체 농도마다 MFI 값으로부터 계산하고 스캐차드 플롯으로 나타낸다. 도 4는 몇몇 사람화된 A0의 MFI/항체 농도의 관계를 도시한 것이다. 이 결과는 출발 항체로서 일부 사람화된 형태가 라모스 세포에 대한 결합성이 유사하고, 해리상수(K_d)가 2.15 내지 4.90 나노몰/리터 범위임을 보여준다.
- [0182] 실시예 5
- [0183] 사람화된 키메릭 mAb A0의 ADCC 활성
- [0184] 사람화된 A0(B, C, D, H, J, K로 표시됨; 표 1 참조)이 항체 의존적 세포 매개된 세포독성(ADCC)을 매개하는 능력은 표적 세포로 라모스 세포를 이용하고 효과기 세포로 IL2-자극을 받은 사람 PBMC를 사용하여 평가한다. 라모스 세포(버킷 림프종; ATCC #CRL-1596)는 ATCC에서 구입했다. 세포는 배양 배지로 10% 열불활성화된 소태아 혈청, 12.5mM HEPES, 1mM 소듐 피루베이트, 1% MEM 비필수 아미노산이 보충된 RPMI-1640 + GlutaMAX를 이용하여 조직 배양 플라스크(175cm²)에서 증식시킨다. 세포는 가슴 대기 중의 5% CO₂, 37℃에서 3일 동안 3×10^5 세포/ml의 초기 밀도로 배양한다. 이 배양물은 매주 2 내지 3회 새 배양 배지와 1:6의 비율로 계대배양하여 3×10^5 및 1.8×10^6 /ml 사이의 세포 농도로 유지시킨다. 세포 밀도가 1.5×10^6 /ml 내지 1.8×10^6 /ml 사이이고 대수기 상태인 세포 배양물의 분취량을 10분 동안 원심분리한다(200 x g, 즉 1000rpm). 세포는 세척 배지(RPMI 1640, L-글루타민 없이)로 1회 세척하고 펠릿화했다(200 x g, 즉 1000rpm; 10분). 세포 펠릿은 분석 배지[L-글루타민 없이 RPMI 중의 1% BSA]에 재현탁시키고 세포수를 계수한다. 세포 농도는 2×10^5 /ml로 조정한다.
- [0185] PBMC를 분리하기 위해, 건강한 공여체에서 채혈한 전혈 약 50 내지 80ml를 사용한다. 50ml 튜브에서 전혈 10ml를 26ml HBSS(칼슘과 마그네슘이 없는 Hanks' Balanced Salt Solution)로 1:3.6의 비율로 희석한다. 희석된 전혈 18ml를 50ml 튜브 중의 12ml Lymphoprep(Nycomed Pharma) 표면에 적층하고 370 x g (1400rpm)으로 35분 동안 원심분리한다. 계면의 단핵세포를 흡인분리하여, 먼저 HBSS로 세척하고(750 x g, 즉 1900rpm; 10분), 그 다음 두번째는 HBSS로 세척하며(300 x g, 즉 1200rpm; 10분)로, 마지막에는 HBSS로 세척한다(160 x g, 즉 900rpm; 10분). 펠릿화된 세포는 배양 배지/분석 배지(L-글루타민이 없는 RPMI 1640 중에 10% 열불활성화된 사람 AB 혈청)에서 피펫을 이용하여 부드럽게 재현탁시킨 뒤, 세포수는 세포 계수기로 측정한다. PBMC 농도는

1×10^7 /ml로 조정한다. 갯분리된 PBMC(5×10^5 /ml)는 배양 배지(10% 사람 AB 혈청이 보충된, L-글루타민 무함유 RPMI 1640)가 주입된 조직 배양 플라스크(75cm²)에서 37°C, CO₂ 항온배양기에서 하룻밤 동안 보존했다. 다음날, 세포는 최종 농도 1U/ml의 hIL-2로 3일 동안 자극을 주었다. IL-2 자극을 받은 PBMC는 Lymphoprep 구배에서 세포 파편과 분리한다. 정제된 IL-2 자극을 받은 PBMC는 세포 배지/분석 배지에 1×10^7 /ml의 농도로 현탁시킨다.

[0186] 특이적 항체 또는 비특이적 항체의 존재 하에 표적 세포와 효과기 세포의 공동 배양은 1:1 비율로 RPMI 중에 10% 사람 AB 혈청과 1% BSA로 이루어진 분석 배지가 웰당 200 μ l의 최종 부피로 담긴 96웰 둥근바닥 미세역가 플레이트에서 2반복 또는 3반복으로 수행한다. 먼저 효과기 세포(웰당 100 μ l의 10% 사람 AB 혈청을 함유한 RPMI 중의 갯분리된 PBMC 세포)를 평판배양한 다음, 표적 세포와 항체 용액을 1% BSA를 함유한 RPMI 50 μ l로 희석한다. 대조군으로, 효과기 세포는 분석 배지만을 사용하고 배양하고(효과기 세포 대조군), 표적 세포는 분석 배지만을 사용하거나(자발적 용해) 또는 1% Triton X-100이 보충된 분석 배지를 사용하여(최대 용해) 배양한다. 공동배양은 37°C 가습 CO₂ 항온배양기에서 3시간 동안 항온배양한다. 항온배양 완료시, 실온에서 원심분리(200 x g, 즉 1000rpm; 10분)하여 배양 배지로부터 세포를 제거한다. 무세포 상청액(100 μ l/웰)을 96웰 편평 바닥 플레이트의 대응 웰로 이동시킨다. 이 상청액 중의 LDH 활성을 측정하기 위해 100 μ l 반응 혼합물(갯 혼합된 250 μ l 촉매와 11.25ml 염료 용액)을 각 웰에 첨가하고, 실온의 암실에서 30분 동안 항온처리한다. 그 다음 흡광도는 아래에 기술된 바와 같이 측정한다.

[0187] ADCC 활성의 측정에는 세포독성 검출 키트(LDH; Roche)를 사용한다. 세포독성의 검출은 원형질막 손상된 세포로부터 방출되는 LDH 효소 활성의 측정을 기초로 한다. 배양 상청액으로 방출된 LDH는 키트의 테트라졸륨 염을 포르마잔(formazan)으로 환원시킨다. 포르마잔 염료의 최대 흡광도는 ELISA 플레이트 판독기에서의 650nm 참조 파장과 대비되게 490nm에서 측정한다. 세포 매개된 세포독성의 백분율을 계산하기 위해 각 실험 상황마다 5개의 대조군을 수행한다.

[0188] 배경 대조군 I(1): 분석 배지에 함유된 LDH 활성, (3)과 (5)의 값에서 뺀다.

[0189] 배경 대조군 II(2): 1% Triton-X100이 첨가된 분석 배지 중의 LDH 활성, 최대 LDH 방출 값(4)에서 뺀다.

[0190] 자발적 LDH 방출(3): 표적 세포에서만 방출된 LDH 활성.

[0191] 최대 LDH 방출(4): 최대 방출가능한 표적 세포 중의 LDH 활성.

[0192] 효과기 세포 대조군(5): 효과기 세포에서만 방출된 LDH 활성.

[0193] 세포 매개된 세포독성 백분율을 측정하기 위해, 3반복 또는 2반복의 평균 흡광도를 계산하고 제조자의 지시에 따라 배경값을 뺀다. 도 5에는 25:1의 E:T비와 라모스 표적 세포를 이용한 ADCC 분석 유래의 결과가 도시된다. 항체는 30ng/ml의 농도로 첨가한다. 출발 mAb 및 이의 사람화된 형태는 모두 라모스 세포에 대해 유사한 ADCC 활성을 보여준다. 결론적으로, 항-CD37 mAb A의 사람화는 이의 ADCC 유도능을 유의적으로 변경시키지 않는다.

[0194] 실시예 6

[0195] 사람화된 키메라 mAb A0의 아포토시스촉진 활성

[0196] mAb A0(=A) 및 이의 사람화된 형태(B, C, D 및 I; 표 1 참조)의 아포토시스촉진 활성은 라모스 세포를 mAb와 항온처리한 후 AnnexinV/PI 양성 세포를 측정하여 평가한다. 라모스 세포(버킷 림프종; ATCC #CRL-1596)는 ATCC에서 공급받는다. 세포는 배양 배지로 10% 열불활성화된 소태아 혈청, 12.5mM HEPES, 1mM 소듐 피루베이트, 1% MEM 비필수 아미노산이 보충된 RPMI-1640 + GlutaMAX를 이용하여 조직 배양 플라스크(175cm²)에서 증식시킨다. 세포는 가습 대기 중의 5% CO₂, 37°C에서 3일 동안 3×10^5 세포/ml의 초기 밀도가 되게 배양한다. 이 배양물은 매 주 2 내지 3회 새 배양 배지와 1:6의 비율로 계대배양하여 3×10^5 및 1.8×10^6 /ml 사이의 세포 농도로 유지시킨다. 세포 밀도가 1.5×10^6 /ml 내지 1.8×10^6 /ml 사이이고 대수기 상태인 세포 배양물의 분취량을 10분 동안 원심분리한다(200 x g, 즉 1000rpm). 세포는 세척 배지(RPMI 1640, L-글루타민 없이)로 1회 세척하고 펠릿화했다(200 x g, 즉 1000rpm; 10분). 세포 펠릿은 배양 배지에 재현탁시키고, 세포수를 측정한다. 세포 농도는 1×10^6 /ml로 조정한다. 웰당 세포 현탁액 100 μ l를 96웰 둥근바닥 플레이트에 평판배양한다. 항체는 10% FBS를 함

유하는 세포 배양 배지로 희석하고, 웰마다 항체 용액을 100 μ l씩 첨가한다. 세포를 37 $^{\circ}$ C CO₂ 항온배양기에서 20 내지 24시간 항온배양하고, 그 후 Vybrant 아포토시스 분석 키트 #2를 사용하여 염색한다. 세포에 Alexa Fluor 488 표지화된 아넥신 V 및 프로피듐 요오다이드 용액을 첨가하고 암실에서 15분간 항온처리한다. 그 후, 세포는 400 μ l 아넥신 V 결합 완충액에 재현탁시키고 BD FACS Canto를 이용하는 FACS 분석으로 처리한다. 아넥신 V 양성 /PI 음성 세포 및 아넥신V/PI 양성 세포의 백분율은 FL1/FL2 채널을 이용하는 2차원 점 블롯으로 측정한다. 이 소타입 정합성 비결합 항체(Sigma 사람 IgG1)는 음성 대조군으로 사용한다.

[0197] 도 6에는 각종 사람화된 mAb A 형태가 라모스 세포에 미치는 아포토시스촉진 효과가 도시되어 있다. 세포는 10 μ g/ml의 항체와 24시간 동안 항온배양되고, 아넥신V 양성 세포(PI 양성 및 PI 음성)의 총 백분율이 표시된다. 모 mAb A는 강력한 아포토시스촉진 활성을 나타낸다. 놀랍게도, 사람화된 형태는 모 mAb A에 비해 아넥신V 양성 세포 수의 유의적인 감소를 나타내어, 사람화된 항체의 변경된 아포토시스촉진 활성을 시사했다. 결론적으로, mAb A의 사람화는 이 실험 상황에서 아포토시스촉진 활성의 감소를 유도한다.

[0198] 실시예 7

[0199] Fc 유전자조작된 형태의 키메라 mAb A0의 ADCC 활성

[0200] Fc 유전자조작된 mAb A0 형태(A1, A2, A3, A4로 표시; 표 2 참조)의 ADCC 활성은 표적 세포로서 라모스 세포를 이용하여 평가한다. ADCC 분석은 전술한 바와 같이 수행한다(실시예 5). 이 실험의 결과는 도 7에 도시된다. Fc 유전자조작된 A0 형태는 모 mAb A0에 비해 분명하게 향상된 효력과 효능을 나타낸다. 특정 Fc 변형체는 모 mAb A에 비해 최고 100%의 최대 용해성의 향상 및 모 mAb에 비해 최고 10배의 EC₅₀의 향상을 나타낸다. 결론적으로, 특정 Fc 돌연변이체의 도입은 키메라 mAb A0의 ADCC 활성을 강력하게 증가시킨다.

[0201] 실시예 8

[0202] Fc 유전자조작된 mAb B0 형태의 ADCC 활성

[0203] Fc 유전자조작된 mAb B0(B1, B2, B3, B4로 표시; 표 2 참조)의 ADCC 활성은 표적 세포로서 라모스 세포를 이용하여 평가한다. ADCC 분석은 전술한 바와 같이 수행한다(실시예 5). Fc 유전자조작된 B0 형태는 모 mAb B0에 비해 분명하게 향상된 효력과 효능을 나타낸다. 특정 Fc 변형체는 모 mAb에 비해 최고 80%의 최대 용해성의 향상 및 모 mAb에 비해 최고 20배의 EC₅₀의 향상을 나타낸다. 결론적으로, 특정 Fc 돌연변이체의 도입은 사람화된 mAb B0의 ADCC 활성을 강력하게 증가시킨다. 이 실험의 결과는 도 8에 제시한다.

[0204] 실시예 9

[0205] mAb A0 및 B0의 아포토시스촉진 활성

[0206] 항-IgG mAb와 가교결합하기 전과 후에 라모스 세포에 미치는 mAb A0 및 B0의 아포토시스촉진 활성은 도 9에 도시한다. 아포토시스 분석은 실시예 6에 기술된 바와 같이 수행하고, 항체 가교결합을 위해 항체에 항-사람 IgG 항체(γ 쇄 특이적; Sigma)를 1:1의 비율로 첨가하고, 표적 세포에 첨가하기 전에 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 항온처리한다. 도 9에서 CD37 특이적 mAb는 가교결합의 유무 하에 1 μ g/ml의 농도로 첨가한다. 키메라 mAb A0은 가교결합 없이도 아포토시스의 강력한 유도인자로, 이 효과는 mAb의 가교결합 후에 유의적으로 증가한다. 놀랍게도, 가교결합 전에, 사람화된 mAb B0은 아포토시스촉진 활성이 전혀 없지만, 항-IgG Ab와 가교결합한 후 강력한 아포토시스촉진 활성을 나타낸다. 결론적으로, 본 실험은 사람화된 mAb A0 형태의 아포토시스촉진 활성은 항체 가교결합 후에 복원될 수 있음을 보여준다.

[0207] 실시예 10

[0208] Fc 유전자조작된 mAb A0의 아포토시스촉진 활성

[0209] Fc 유전자조작된 키메라 mAb A0가 라모스 세포에 미치는 아포토시스촉진 활성은 실시예 6에 기술된 바와 같이 아넥신V/PI 염색으로 평가한다. 모 항체 A0과 Fc 유전자조작된 변형체 A2 및 A4는 0.1 내지 10.000ng/ml의 농도

범위에서 적정된다. 도 10에서 볼 수 있듯이, 3개 항체는 모두 유사한 아포토시스촉진 활성을 나타낸다. 결론적으로, 본 실험은 mAb A0의 Fc 유전자조작이 아포토시스촉진 활성을 변경시키지 않는다는 것을 보여준다.

실시예 11

a) 전혈 분석에서 Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2의 B 세포 고갈 활성

사람 혈액으로부터 정상 B 세포를 고갈시키는 효능과 효력은 전혈 분석으로 평가한다. 이 분석 양식에서, 시험 항체는 건강한 개체에서 채취한 사람 혈액의 EDTA 처리 샘플에 첨가되고, 이어서 37℃에서 3 내지 4시간 항온처리된 후, B 세포의 수를 4색 FACS 분석으로 정량 분석한다. 완충액이나 IgG 대조군과 비교하여 시험 제제에 의한 B 세포 고갈의 정도를 계산할 수 있다. 사람의 생체내 상황과 유사한 사람 IgG 수준과 효과기 세포의 존재로 인해, 이 분석 형태는 생체내 시험 항체의 효과를 예측하는데 높은 관련성이 있는 것으로 생각된다.

정량적 FACS 분석은 건강한 개체 유래의 혈액 샘플에 존재하는 B 세포 및/또는 스파이크 처리된 라모스 세포의 수를 측정하는데 사용된다. 정량분석은 당해의 세포 집단의 정량분석을 위한 내부 표준물로 작용하는 공지된 수의 형광 비드를 함유하는 BD Trucount 튜브를 이용하여 수행한다. B 세포는 FSC/SSC 분석과 함께 4가지 다른 CD 마커(CD3/CD14/CD19/CD45)를 이용한 4색 분석으로 동정한다.

웰당 신선한 혈액 270 μ l를 2반복으로 30 μ l 항체 희석물(PBS 중에) 또는 PBS(완충액 대조군)와 함께 48웰 플레이트에서 항온배양한다. 샘플을 37℃에서 4시간 동안 항온처리하고 그 후 즉시 얼음에 넣는다. CD 마커 마스터 혼합물 33 μ l를 Trucount 튜브에 첨가하고, 혈액-항체 혼합물 50 μ l를 첨가한다. 샘플을 볼텍싱하고 실온에서 15분 동안 항온배양한다. 그 다음, 용해 완충액 450 μ l를 첨가하고, 볼텍싱하고, 실온에서 추가 15분 동안 항온배양한다. 샘플을 얼음에 넣고 즉시 BD FACS Canto™ Flow Cytometer를 이용하여 FACS 분석으로 처리한다. 데이터의 평가는 BD FACSDiva 소프트웨어(Version 5.0.2)를 이용하여 수행한다.

Fc 유전자조작된 키메라 및 사람화된 mAb A2 및 B2는 정상 B 세포 고갈 효력이 우수하고 0.15 내지 0.35nM 범위의 EC₅₀ 값을 나타낸다. 정상 B 세포 고갈의 정도는 57% 내지 65% 범위이다. B-NHL 치료에 사용되는 등록된 항체인 리툽시마브를 병행 시험한 결과, 이 분석 양식에서 훨씬 낮은 B-세포 고갈을 나타낸다(도 11A).

b) Fc 유전자조작은 리툽시마브에 비해 A0 및 B0의 우수한 B 세포 고갈 활성을 도입시킨다.

건강한 개체 유래의 사람 혈액에서 B 세포 고갈에 미치는 mAb의 효과는 a)에 기술된 바와 같이 평가한다. Fc 유전자조작되지 않은 mAb A0 및 B0은 리툽시마브와 유사한 13% 내지 26% 범위의 B 세포 고갈 활성을 나타낸다. Fc 유전자조작은 두 mAb의 B 세포 고갈 활성을 급격히 증가시키며, 75%의 평균 고갈 백분율을 나타낸다. 이것은 리툽시마브에 비해 A2 및 B2의 우수성을 분명하게 입증한다(도 11B).

c) 항체 A2 및 B2는 전혈 분석에서 T 세포 및 단핵구를 고갈시키지 않는다.

T 림프구(CD3 양성) 및 단핵구(CD14 양성)에 미치는 A2 및 B2의 효과는 B 림프구에 미치는 효과와 병행하여 평가한다. T 세포 수 또는 단핵구 수의 유의적인 변화는 전혀 관찰되지 않는 반면, B 세포의 수는 유의적인 감소가 관찰된다(도 11C). 이것은 A2 및 B2가 사람 혈액으로부터 B 세포를 특이적으로 고갈시킨다는 것을 시사한다.

실시예 12

Fc 유전자조작은 리툽시마브에 비해 우수한 ADCC 활성을 도입시킨다.

mAb A0의 Fc 유전자조작된 A2 형태의 ADCC 활성은 표적 세포로서 라모스 세포를 이용하여 평가한다. ADCC 분석은 전술한 바와 같이 수행한다(실시예 5). Fc 유전자조작되지 않은 항체 A0은 B 세포 림프종을 앓고 있는 환자 치료용으로 승인을 받은 CD20 특이적 항체인 리툽시마브에 비해 열등한 라모스 표적 세포의 최대 용해를 나타낸다. 놀랍게도, A0의 Fc 유전자조작은 리툽시마브에 비해 분명하게 향상된 A2의 효력과 효능을 초래한다. 이는, 라모스 세포 상의 CD20과 CD37의 항원 밀도가 유사한 상황에서, Fc 유전자조작된 항-CD37 mAb A2가 리툽시마브보다 분명하게 증가된 ADCC 활성을 나타낸다는 것을 시사한다(도 12).

실시예 13

- [0224] 전혈 분석에서 Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2의 림프종 세포 고갈 활성
- [0225] 사람 혈액에서 취한 버킷 림프종 유래 세포주인 라모스 세포를 고갈시키는 효능 및 효력은 실시예 11에 기술된 바와 같이 전혈 분석을 이용하여 평가한다. 이 분석의 변형으로, 라모스 종양 세포는 전혈 매트릭스 내로 내인성 B 세포에 비해 약 10배 과량으로 스파이크처리되고, 이들의 고갈은 역시 FACS 분석으로 모니터링한다. Fc 유전자조작된 키메릭 및 사람화된 mAb A2 및 B2는 0.35 내지 0.54nM 범위의 EC_{50} 값으로, 라모스 세포 고갈에 대한 양호한 효력을 나타낸다. 라모스 세포의 고갈 정도는 36% 내지 55% 범위이다. B-NHL의 치료에 사용되는 등록된 항체인 리툭시마브는 병행 시험한 결과, 이 분석 양식에서 라모스 세포의 고갈 정도가 훨씬 낮았다(도 13).
- [0226] 실시예 14
- [0227] 질환 관련 모델에서 Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2의 생체내 효능
- [0228] mAb A2 및 B2의 생체내 항종양 효능은 누드 마우스의 라모스 버킷 림프종 모델을 이용하여 평가한다. CD37 양성 라모스 세포를 동물의 옆구리로 피하 주사하고, 종양이 형성되면 동물의 정맥내 치료를 개시한다. 1주 2회 치료 스케줄을 선택하고(q3/4d), 2가지 다른 용량(8mg/kg 및 25mg/kg)을 병행 시험한다. 두 mAb는 유의적인 항종양 효능을, 0.2% 내지 26% 범위의 T/C 값으로 나타낸다. 두 용량 수준간에, 그리고 두 항체간에 유의적인 차이는 관찰되지 않는다. 하지만, 고용량 A2 처리된 동물에서 0.2% T/C와 5/10 완전 종양 퇴화를 나타내며 효능이 더 우수한 경향이 있다. 모든 처리는 명백한 체중 감소 없이 잘 견딜 수 있는 치료이다. 결론적으로, mAb A2 및 B2는 최대 활성이 8mg/kg 용량 수준에서 이미 수득된 라모스 버킷 림프종 모델에서 유의적인 항종양 효능을 나타냈다. 이 활성은 병행 시험된 리툭시마브의 활성과 비슷하다. Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2에 의해 관찰된 생체내 활성은, 이 mAb들이 쥐 효과기 세포가 아닌 사람 효과기 세포와의 상호작용에 대해 최적화된 것이기 때문에 과소평가된 것일 수 있음을 유의해야 한다. 사람 효과기 세포를 이용할 때 시험관내에서 ADCC 활성을 강력하게 증가시키는 상호작용의 최적화(실시예 8)는 사용된 마우스 모델에는 반영되지 않았다. 하지만, 본 실험에서 수득된 데이터(도 14 참조)는 CD37 표적화 개념의 생체내 증거를 제공한 것으로, 사람의 치료 용량을 추정하는데 사용될 수 있다.
- [0229] 실시예 15
- [0230] 사람의 치료학적 용량을 추정하기 위한, 마우스에서의 A2 및 B2의 약동학 및 약리학 효과의 상관관계
- [0231] A2 및 B2의 혈청 농도 간에 이들의 약리학 효과에 대한 상관관계는 라모스 종양 이종이식편 모델을 이용하여 마우스에서 조사한다. 이 연구는 8mg/kg 용량의 A2 및 B2(시트르산염 완충액: 25mM Na-시트르산염, 115mM NaCl, 0.04% Tween 80, pH 6.0)에 조제됨)가 마우스에서 표준 q3 또는 4d 항체 용량투여 스케줄을 사용하는 상가 공격성 s.c.(피하) 종양 모델에서 종양 성장의 유의적인 지연을 유발하여, 용량투여 간격 동안에도 활성의 지속을 나타낸다는 것을 입증한다. 또한, 동일한 용량의 약동학 데이터도 수득된다.
- [0232] 마우스에서 이러한 PK/PD 관계를 사용하면, 사람에서 사람화된 항체의 제거율(CL)에 대한 공개 데이터(Lobo et al., 2004)를 이용함으로써 사람의 추정 용량을 계산할 수 있다.
- [0233] A2에 대한 전체 계산:
- [0234] $\cdot 8\text{mg/kg}$ 의 단일 용량 후 평균 $AUC(0-\infty) = 6099 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$.
- [0235] \cdot 마우스에 주어진 $AUC(0-\infty) =$ 마우스의 $AUC(ss, \tau)$ 및 $AUC(ss, \tau)/\tau = C(\text{ave}, ss)$.
- [0236] \cdot 마우스의 $C(\text{ave}, ss)(\tau=84\text{시간 동안}) = 73\mu\text{g/ml}$, 사람($\tau=168\text{시간}$)의 $C(\text{ave}, ss)$ 와 등가인 것으로 추정됨).
- [0237] \cdot 사람의 $AUC(ss, \tau)$ 가 D/CL 이고, Lobo et al., 2004에 보고된 사람에서 사람화된 항체 제거율(CL) 범위를 사용하기 때문에 $CL = 7\text{ml/h/70kg}$ 내지 15ml/h/70kg .
- [0238] $\cdot 7\text{ml/h/70kg}$ 의 경우 : $168\text{hr} \times 7 = 1176\text{ml} \times 73\mu\text{g} = 86\text{mg}$.
- [0239] $\cdot 15\text{ml/h/70kg}$ 의 경우 : $168\text{hr} \times 15 = 2520\text{ml} \times 73\mu\text{g} = 184\text{mg}$.
- [0240] 따라서, A2의 경우 70kg 사람에 대한 추정되는 주간 용량은 86 내지 184mg 범위이다. 전술한 바와 같은 가정 하

에, 70kg 사람에 대한 B2의 추정되는 사람 주간 용량은 189 내지 404mg이다.

[0241]

실시에 16

[0242]

항체 A2 및 B2는 다발성 골수종 세포에서 ADCC 활성을 나타낸다.

[0243]

다발성 골수종 세포주 패널에서 CD37의 발현은 CD37에 특이적인 항체를 이용하는 FACS 분석으로 평가한다. 세포는 직접 형광표지된 항-CD37 항체 또는 미표지된 CD37 특이적 항체와 함께 항온배양하고, 이어서 1차 항체에 대해 지향성인 2차 형광 표지 항체와 함께 항온배양한다. 표지된 세포의 형광 활성은 FACS Canto Flow Cytometer(BD Biosciences)로 측정하고 형광 강도는 FACS Diva Software를 이용하여 MFI로 기록한다. 시험된 다발성 골수종 11개 중 6개는 CD37의 세포 표면 발현을 나타낸다(도 15). 한 세포주(RPMI 8226)는 CD37 특이적 항체 A2 및 B2를 이용하여 실시예 5에 기술된 바와 같이 ADCC 분석으로 시험한다. 두 항체는 25ng/ml 범위의 EC₅₀ 값과 약 20%의 최대 세포 용해를 나타내며 RPMI 8226 세포에 대한 강력한 ADCC 활성을 입증한다(도 16). 본 실시예는 CD37 양성 다발성 골수종 세포가 CD37 특이적 mAb A2 및 B2를 이용한 ADCC 매개된 세포 용해에 민감하다는 것을 증명한다.

[0244]

도 15는 CD37 발현에 대한 6가지 다발성 골수종 유래 세포주의 FACS 분석을 도시한 것이다. 흰색 곡선은 CD37 특이적 항체와의 반응성을 나타내고, 흑색 곡선은 음성 대조용 항체를 나타낸다.

[0245]

실시에 17

[0246]

환자 유래의 CLL 세포에 대한 항체 A2 및 B2의 아포토시스촉진 활성

[0247]

A2 및 B2의 아포토시스촉진 활성은 환자 유래의 만성 림프구성 백혈병(CLL) 세포에 대해 평가한다. 헬싱키 선언에 따라 고지된 동의를 얻은 후 CLL 진단을 받은 환자로부터 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 제조한다. 1차 CLL 세포는 갓 채혈한 혈액을 Ficoll-Plaque[®] 플러스 절차(StemCell Technologies, Meylan, France)에 따라 정제하고 사용할 때까지 10% 열불활성화된 사람 AB 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배양 배지(Sigma, France)에서 4℃ 하에 보관한다. 1차 CLL 세포를 위한 배양 배지는 2mM L-글루타민 및 10% 열불활성화된 사람 AB 혈청이 보충된 RPMI 1640이다. 실험을 위해, 1차 CLL 세포는 혈구세포추정기로 계수하고 이들의 생육성은 0.25% 트립판 블루 배제 실험으로 평가한다. CLL 샘플의 생육성은 90% 이상이다. 세포는 항체 30μg/ml와 37℃에서 24시간 동안 항온배양하고, 그 다음 아넥신V 양성 세포의 백분율은 실시예 6에 기술된 바와 같이 측정한다. 도 17에 도시된 바와 같이 Fc 유전자조작된 항체 A2 및 B2는 아넥신V 양성 세포가 약 90%(A2) 및 40%(B2)로, 1차 CLL 세포에 대해 강한 아포토시스촉진 활성을 나타낸다. 두 mAb는 B-NHL 치료용으로 승인을 받은 B 세포 특이적 항체인 리툽시마브보다 우수한 것이 분명하다. 또한, mAb A2는 B-CLL 치료용으로 승인을 받은 항체인 알렘투주마브에 비해 분명하게 우수한 활성을 나타낸다.

[0248]

실시에 18

[0249]

내인성 CD37 유전자가 사람 동족체로 교체된 유전자도입 마우스 모델의 제조

[0250]

표적화 벡터는 사람 CD37의 암호화 서열(BAC(세균 합성 염색체) ID: RP11-433N13, RP11-50I11)을 함유하고 이 옆에 비독성 서열이 인접하게 작제한다. 이 표적 벡터(추가로 loxP 부위 인접 엑손 3-4 및 neo 선택 마커, 인접한 frt 부위를 함유함)는 그 다음 마우스 게놈 서열의 엑손 1 내지 8을 사람 대응 서열로 교체하는 표준 기술 및 마우스 ES 세포를 이용하는 상동 재조합에 사용한다. 이를 위해, C57BL/6N ES 세포주는 20% PBS(PAN) 및 1200 u/ml 백혈병 저해 인자(Millipore ESG 1107)를 함유하는 DMEM 고 글루코스 배지 중의 마우스 배아 섬유아 세포(MEF)로 구성된 유사분열 불활성화된 공급자 세포 층 위에서 증식시킨다. 1×10^7 세포와 선형화된 DNA 벡터 30g을 240V 및 500F에서 전기침투시킨다(Biorad Gene Pulser). G418 선택(200g/ml)은 d2에 시작했다. 간시 클로비르(2M)를 이용한 역선택은 전기침투 후 d5에 시작한다. d8에 ES 클론이 분리되고 표준 절차에 따라 서던 블롯팅, 예컨대 증대후 표적 유전자에 특이적인 방사표지된 DNA 프로브의 사용과 액체 질소에서 동결시켜 분석한다. 유전자도입 동물은 그 다음 당업계에 공지된 표준 절차로 제조하며, 예컨대 포낭 주사 및 이어서 키메라 동물의 생성 등을 이용하여 제조한다. 사람 CD37에 동종접합성 및 이종접합성인 동물은 각각 키메라 및 이종접

합성 동물의 통상적인 육종에 따라 수득한다. 쥐 CD37 유전자의 성공적인 녹아웃과 사람 CD37 유전자의 녹인(knock-in)은 표준 절차를 이용한 단백질 수준에서, 예컨대 말초혈액 림프구의 FACS 분석 또는 조직 절편의 면역조직화학 분석을 이용하여 모니터링한다.

[0251] 실시예 19

[0252] 대용 항체의 제조

[0253] 머카크 CD37에 특이적인 모노클로날 항체는 머카크 CD37 항원의 완전한 암호화 서열을 이용하여 마우스 및 토끼의 유전자 면역화에 의해 수득한다(Acc. No.: ENSMMUT00000020744). 특이적 항체는 머카크 CD37 항원을 발현하는 재조합 HEK293 또는 CHO 세포를 이용하여, 예컨대 표준 ELISA 기술이나 FACS 기술로 선택한다. 이러한 항체들의 가변 중쇄 및 경쇄 암호화 서열은 PCR 클로닝으로 회수하고, 이를 이용하여 키메라 항체(실시예 1에 기술된 바와 같이), 즉 쥐 또는 토끼 출발 항체 유래의 VH 및 VL 영역과 A2 또는 B2와 같은 본 발명의 항체의 Fc 부와 동일한 Fc 부를 수용하는 항체를 생산한다. 결합 및 기능적 성질은 표적 세포로 머카크 CD37 발현 세포를 이용하는 분석 시스템을, 결합, FACS, 스캐차드 분석, ADCC 및 아포토시스 분석 등에 사용하여 조사할 수 있다. 궁극적으로, 대용 항체는 시험관내 사이노몰거스 원숭이 혈액에서 나타나는 B 세포 고갈 활성화에 의하여 선택한다.

[0254] 실시예 20

[0255] 항체 생산용 클론의 제조

[0256] 항체 A2, A4, B2 또는 B4와 같이 본 발명의 항체를 생산하는 클론을 제조하기 위해, 완전한 중쇄를 암호화하는 DNA 분자, 예컨대 서열번호 27, 31, 35 또는 39의 서열을 갖는 DNA 분자를 각각 추가 선택 마커로 햄스터 유래의 디하이드로폴레이트 리덕타제를 암호화하는 pBI-26으로 표시된 진핵생물 발현 벡터에 삽입한다.

[0257] 서열번호 29, 33, 37 및 41에 제시된 완전한 경쇄를 각각 암호화하는 DNA 분자를, 추가 선택 마커로 네오마이신 포스포트랜스퍼라제를 암호화하는 pBI-49로 표시된 진핵생물 발현 벡터에 삽입시킨다. 전체 중쇄 및 경쇄의 DNA 서열은 완전하게 서열분석한다.

[0258] 화학 합성 배지에서 현탁액에서 증식된 햄스터 세포주 CHO-DG44는 전술한 바와 같이 항체의 중쇄 및 경쇄를 위한 진핵생물 발현 벡터로 공동형질감염시킨다. 형질감염된 세포는 하이포잔틴 및 티미딘이 없고 항생제 G418이 첨가된 배지에서 선택한다. 이어서, 세포는 단계별로 선택하고 메토크세이트(MTX)의 증가량을 이용하여 단계별 선택 및 증폭시킨다. 800nM MTX 증폭 단계에서 단세포 클론은 성장 성과 교반배양시의 항체 생산을 기초로 하여 선택하고 세이프티 셀 뱅크(SCB)에서 저온보존한다.

[0259]

참고문헌

- American Cancer Society (Cancer Facts & Figures 2005).
- Baker and Jones, *Curr Opinion in Drug Discovery & Development*, 10, 219-227, 2007.
- Barbas, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813, 1994.
- Barrena et al., *Leukemia* 19: 1376-1383, 2005.
- Belov et al., *Cancer Research* 61: 4483-4489, 2001.
- Boulianne G. L., Hozumi N. and Shulman, M. J., Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* 312: 643, 1984.
- Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R., *Cytometry* 1994, 17(1):75-83.
- Buchsbaum et al., *Cancer Research* 52: 6476-6481, 1992.
- Chothia and Lesk., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987.
- Coiffier B, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood* 1998; 92: 1927-1932.
- Coiffier, *JCO*, 23, 6387-93, 2005.
- Edelman et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 78-85, 1969.
- Feugier P, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4117-4126.
- Foran JM, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 317-324.
- Forstpointner R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, 2004; 104: 3064-3071.
- Francisco et al., *Blood*, 2003 Aug 15;102(4):1458-65.
- Frank, et al., *Methods Enzymol.* 154: 221-249, 1987.

[0260]

- Gait, M.J., *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK (1984).
- Goldenberg DM and Sharkey RM, *Oncogene* (2007) 26, 3734-3744. Novel radiolabeled antibody conjugates.
- Hainsworth JD. Prolonging remission with rituximab maintenance therapy. *Semin Oncol* 2004; 31: 17-21.
- Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 254:889-896, 1992.
- Hayden and Mandeck. Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides. *DNA* 7(8): 571-7, 1988.
- Hertz T, Yanover C: PepDist: A new framework for protein-peptide binding prediction based on learning peptide distance functions. *BMC Bioinform* (2006) 7 (Suppl 1):S3-S17.
- Hiddemann W, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study. Group. *Blood* 2005; 106: 3725-3732 (2005a).
- Hiddemann W, et al. Treatment strategies in follicular lymphomas: current status and future perspectives. *J Clin Oncol* 2005b; 23; 6394-6399.
- Howard OM, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1288-1294.
- Ichimura et al., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 44, 1045-53, 1991.
- Jackson et al., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9.
- Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98, 1991.
- Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, Heise CT, Nayee PD, Sanders DA, Hamilton A, Sweet C, Unitt E, Alexander G, Lo KM et al: The development of a modified human IFN- α 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Interferon Cytokine Res* (2004) 24(9):560-572.

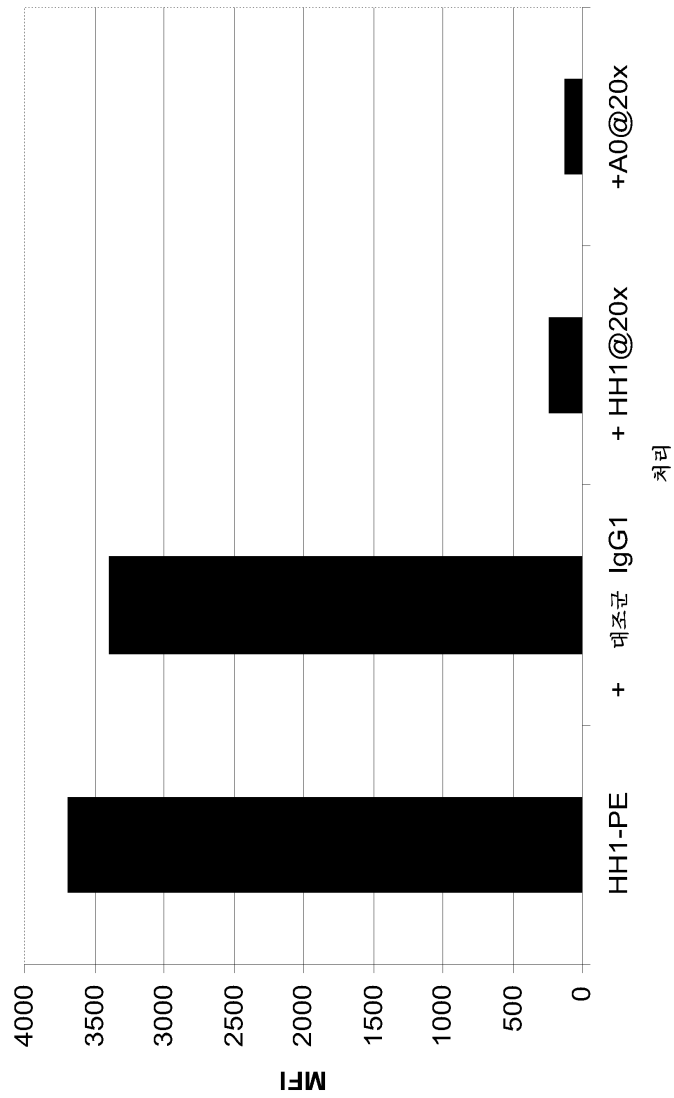
[0261]

- Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP: Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of Factor VIII. *J Thromb Haemost* (2005) 3(5): 991-1000.
- Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th Ed.). NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991.
- Kahl B, et al. Maintenance rituximab following induction chemoimmunotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. *Ann Oncol*, 2006; 17: 1418-1423.
- Kaminski et al., *JCO* 10: 1696-1711, 1992.
- Kipriyanow and Le Gall, *Molecular Biotechnology* 26: 39- 60, 2004.
- Knobeloch et al., *MolCellBiol* 20: 5363-5369, 2000.
- van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MH. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood*, 2002, Sept 15;100(6):2257-9.
- McLaughlin P, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-2833.
- Lazar et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10, 2006.
- Ling and MacLennan, pp. 302-335 in *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, 1987.
- Link et al., *Journal Immunol* 137: 3013-3018, 1986.
- Lobo et al., *J Pharm Sci* 2004;93(11):2645-2668.
- Lowman et al., *Biochemistry* 30(45): 10832-10837, 1991.
- Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783, 1992.
- Moldenhauer G., et al., 1987. Biochemical characterization and epitope analysis of B lymphocyte-specific surface antigens defined by clustering workshop monoclonal antibodies. In *Leukocyte Typing 111*. A. McMichael. ed. Oxford University Press, Oxford. p. 378.
- Moldenhauer G.: CD37. *J. Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14: 281-83.
- Press et al., *JCO* 7, 1989.
- Press OW, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med* 1993; 329: 1219-1224.

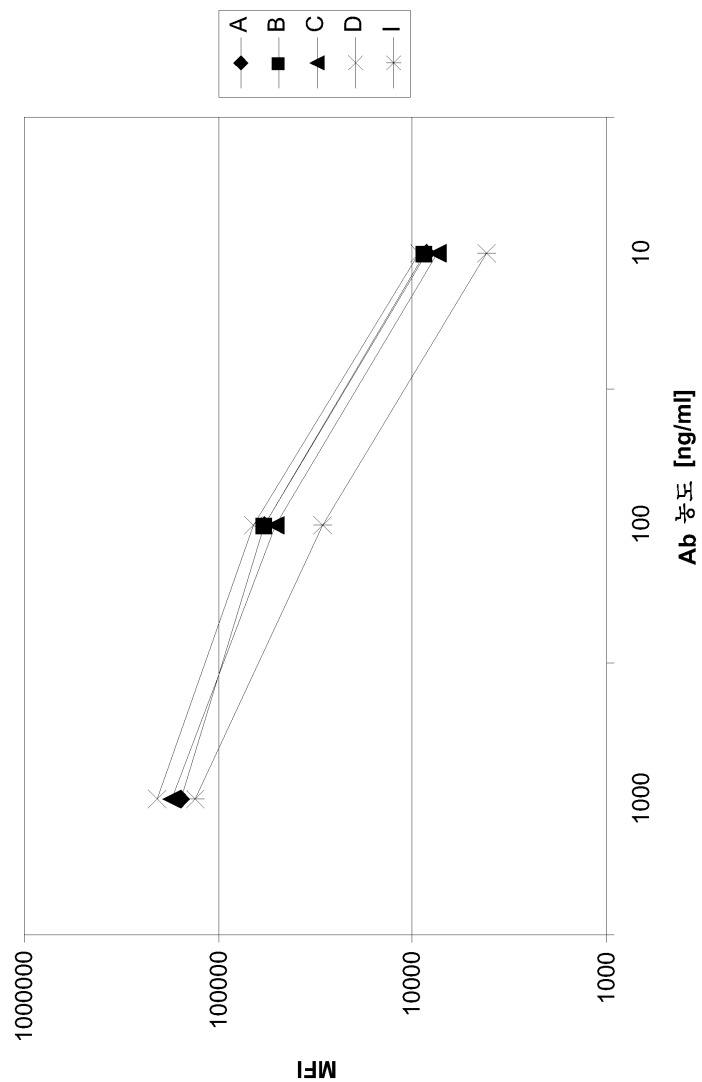
- Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL: Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics* (2004), 56(6):405-419.
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Hendrickson R. Ed.
- Romaguera JE, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 7013-7023.
- Sasse et al., *J. Antibiot.* (Tokyo), 53, 879-85, 2000.
- Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155.
- Schwartz-Albiez et al, *Journal Immunol* 140: 905-914, 1988.
- Stemmer et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, *Gene* 164(1): 49-53, 1995.
- van Spriel et al., *Journal Immunol* 172: 2953-2961, 2004.
- Suzawa et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2175-84, 2000.
- Tangri S, Mothe BR, Eisenbraun J, Sidney J, Southwood S, Briggs K, Zinckgraf J, Bilsel P, Newman M, Chesnut R, LiCalsi C, Sette A: Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J Immunol* (2005) 174(6):3187-3196.
- Thomas DA, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2006; 106: 1569-1580.
- Ye et al. Gene synthesis and expression in *E. coli* for pump, a human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 186(1):143-9, 1992.
- Yelton et al., 1995, *Immunol.* 155:1994-2004.
- Zhao et al., *Blood* 104: Abstract 2515, 2004.
- Zhao XB, Lapalombella R, Joshi T, Cheney C, Gowda A, Hayden-Ledbetter MS, Baum PR, Lin TS, Jarjoura D, Lehman A, Kussewitz D, Lee RJ, Caligiuri MA, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC. Targeting CD37+ lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical 2007; *BLOOD*, 1 OCTOBER 2007, VOLUME 110, NUMBER 7 (Epub ahead of print . *Blood*. 2007 Apr 17)

도면

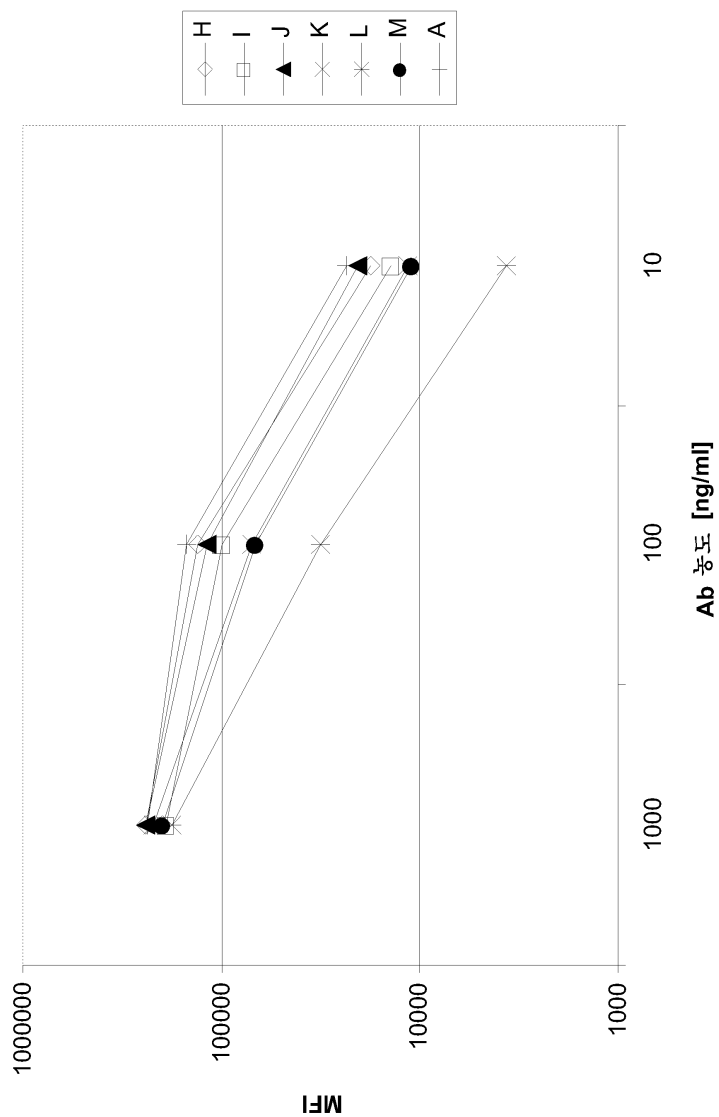
도면1



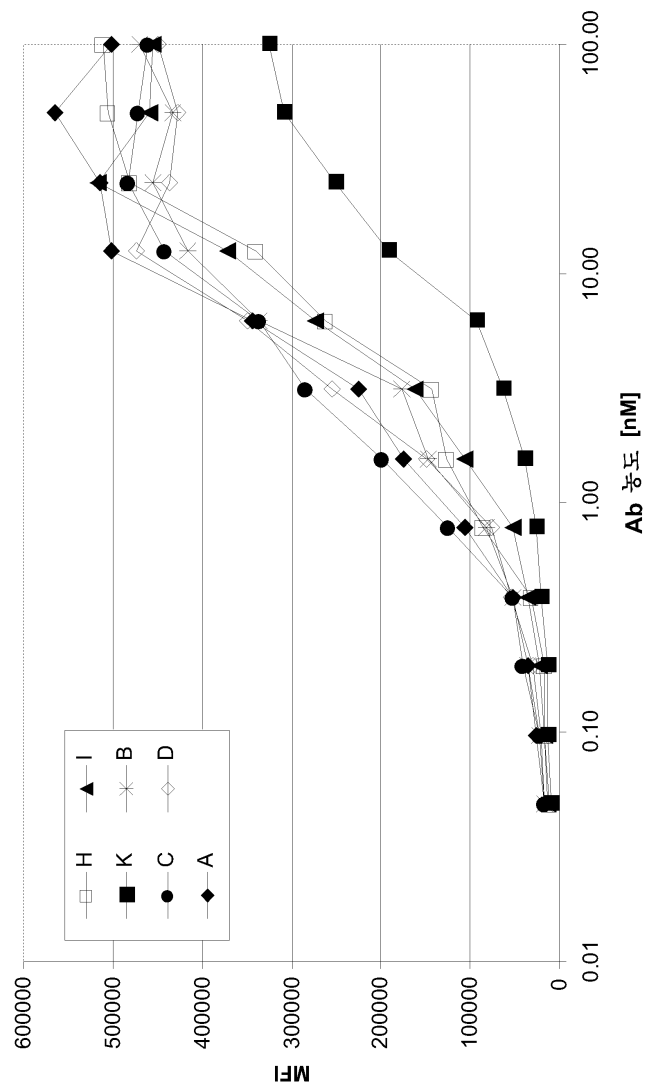
도면2



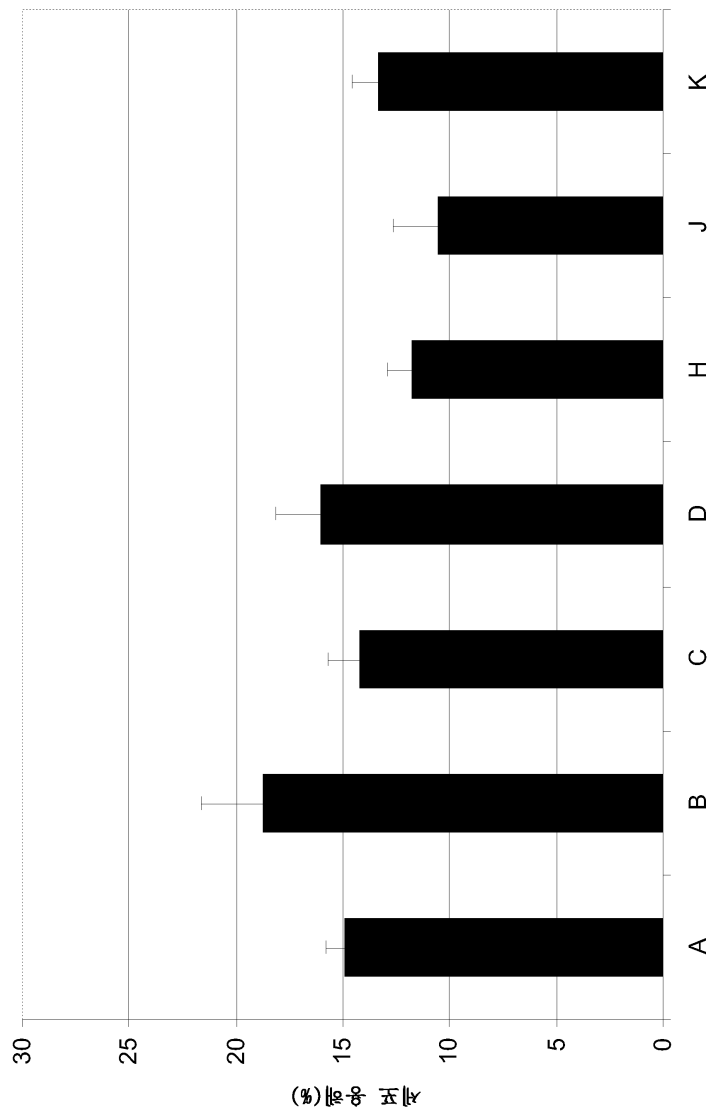
도면3



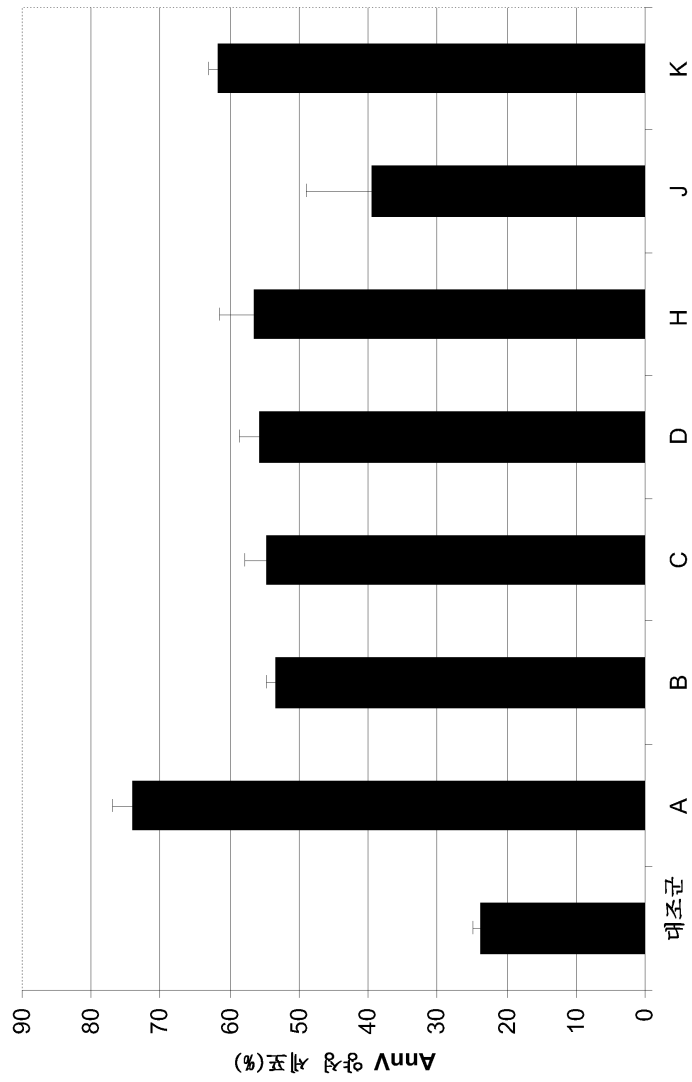
도면4



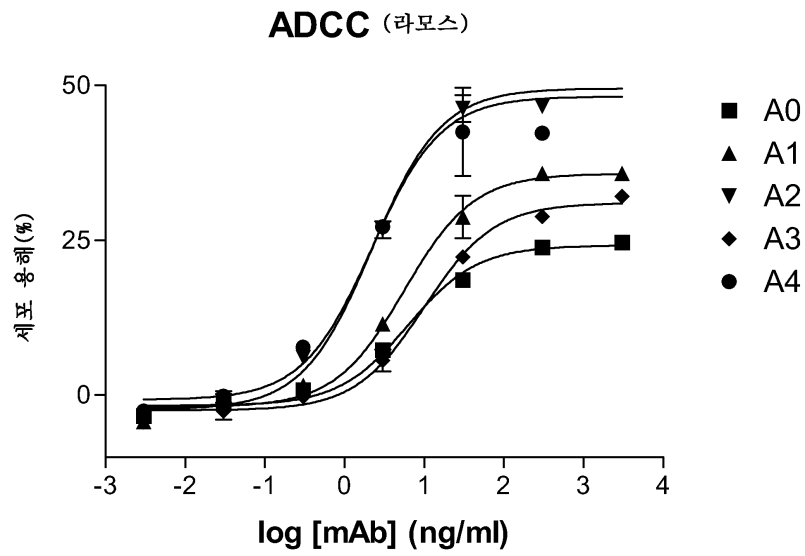
도면5



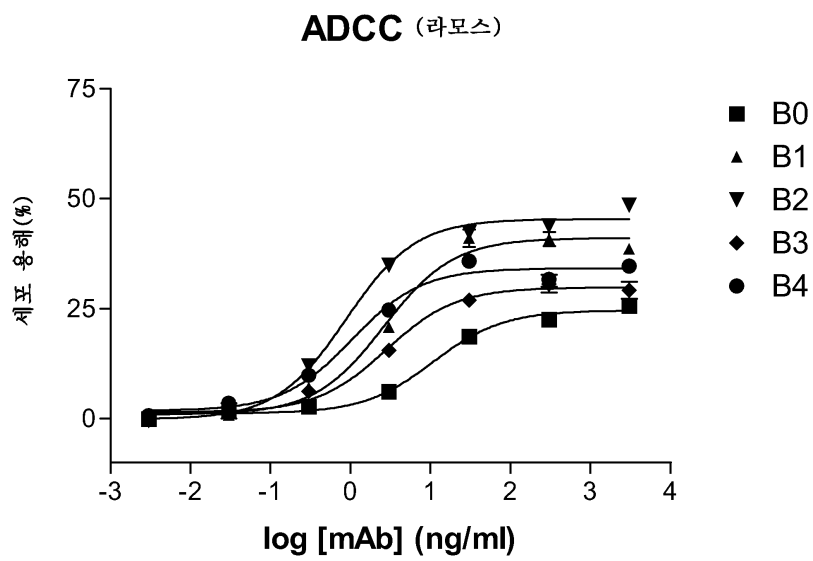
도면6



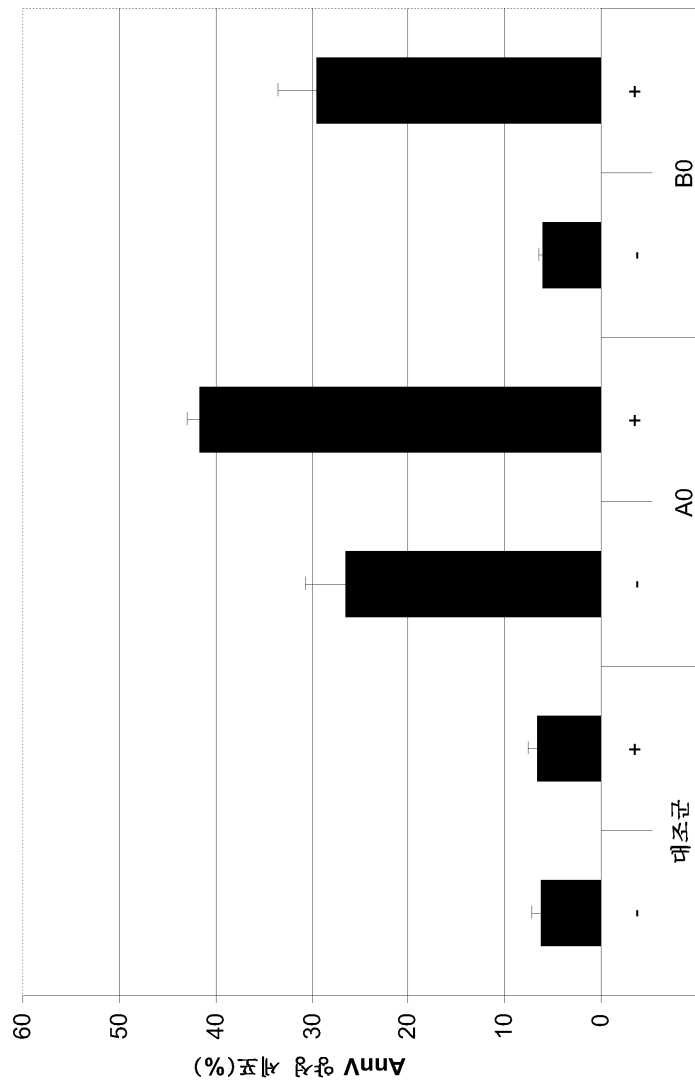
도면7



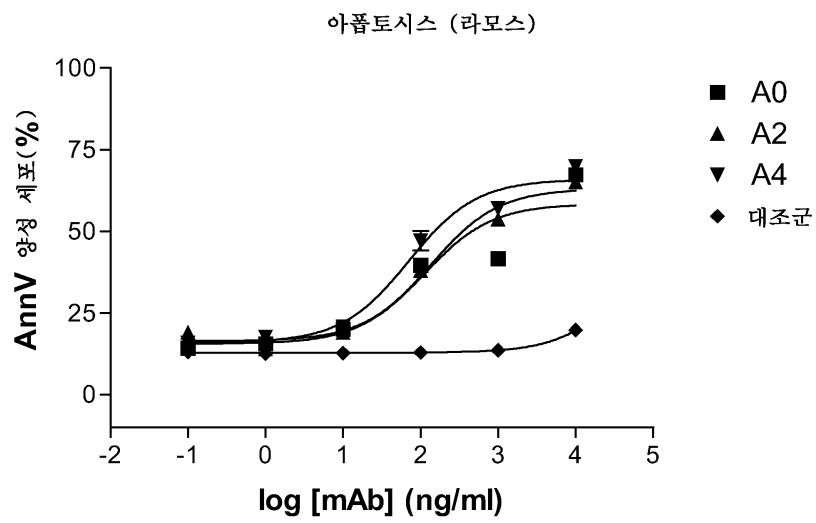
도면8



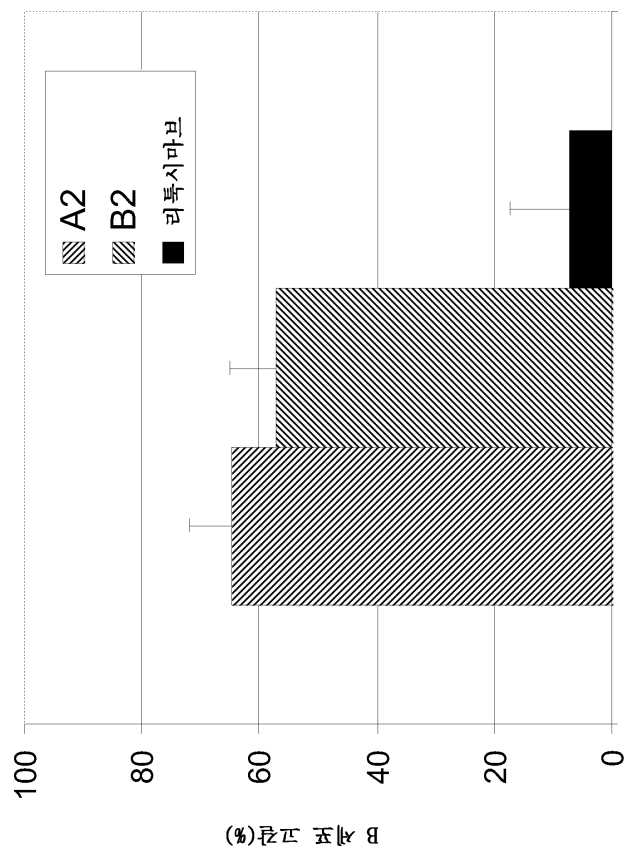
도면9



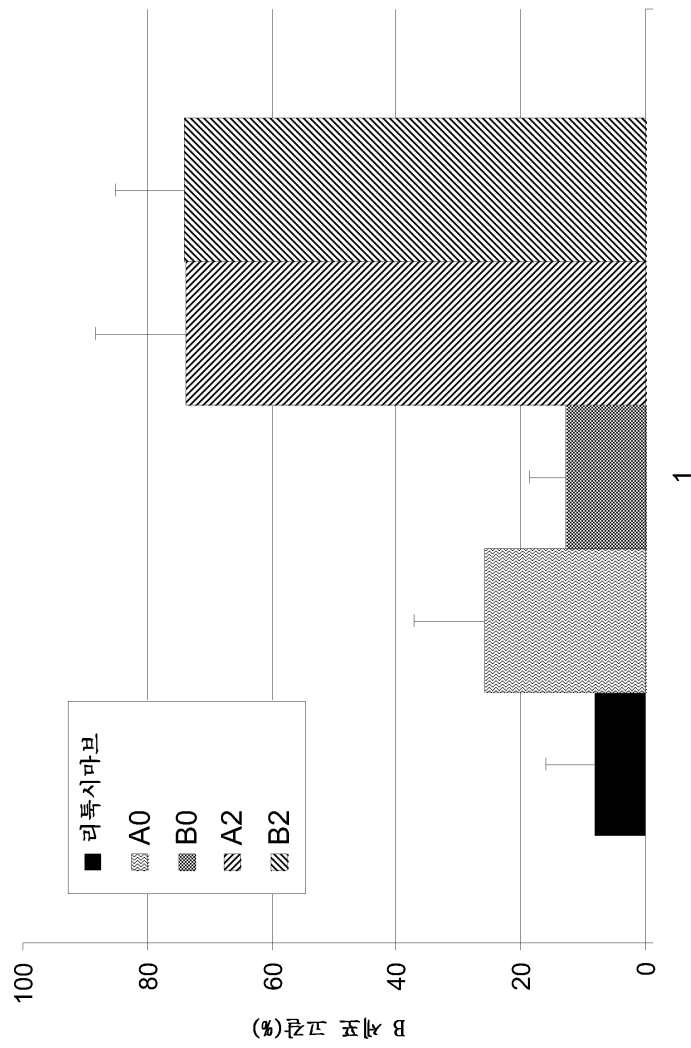
도면10



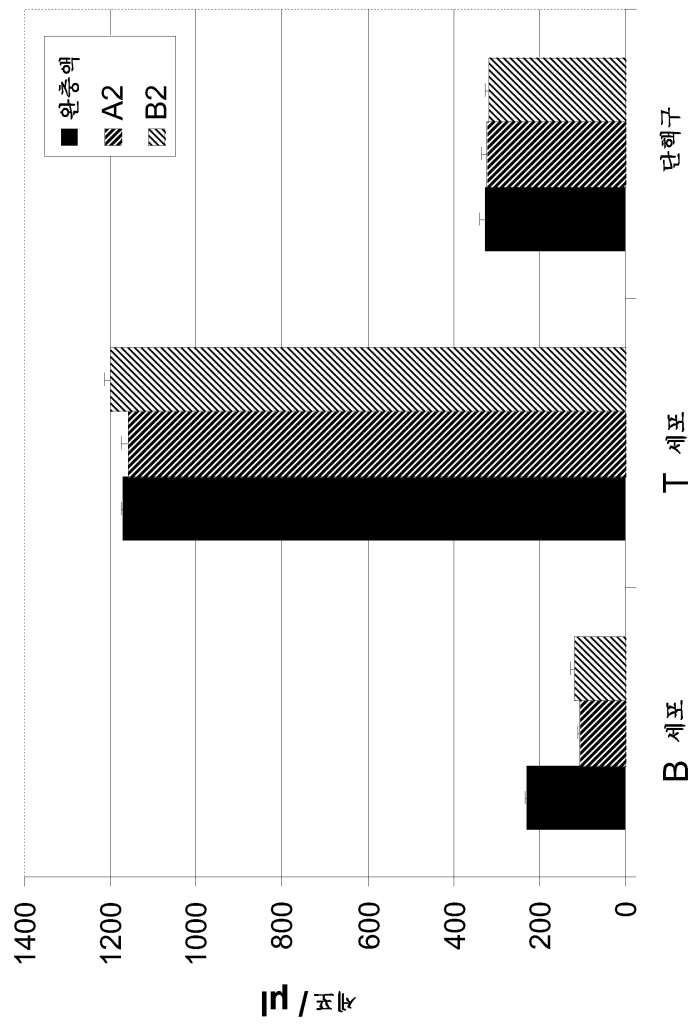
도면11a



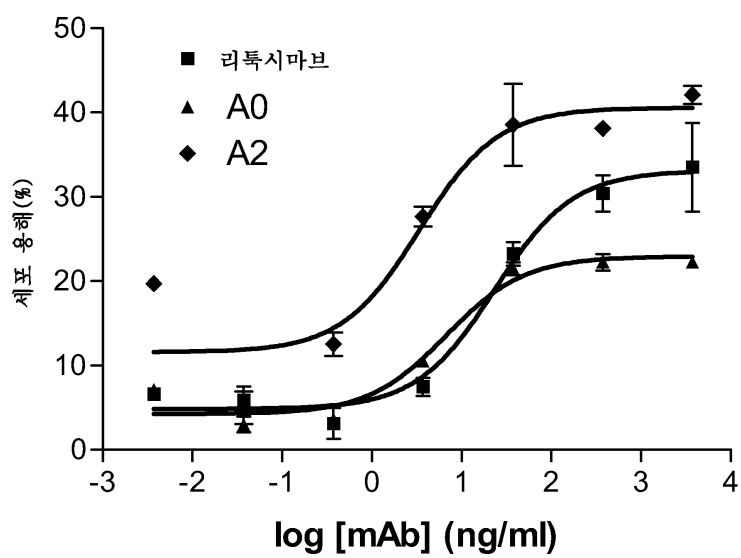
도면11b



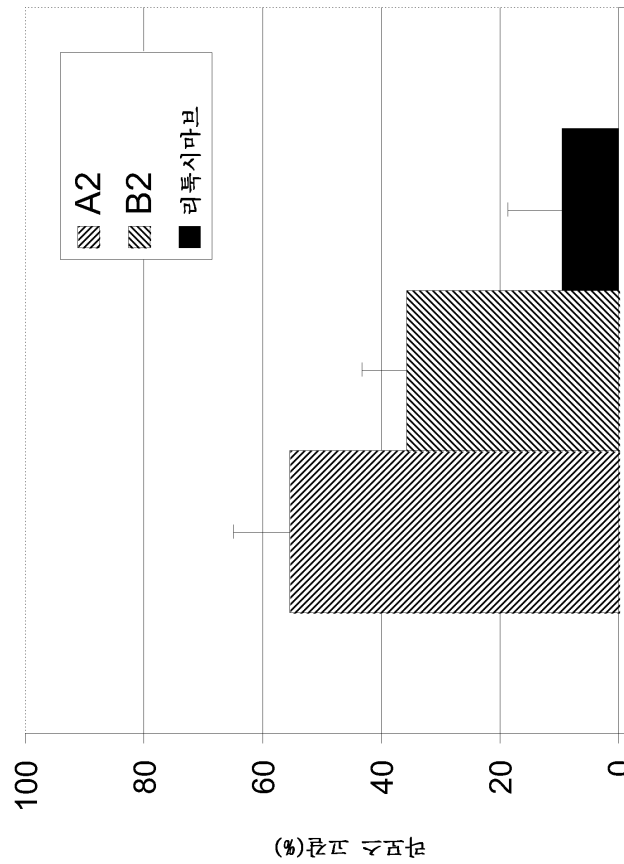
도면11c



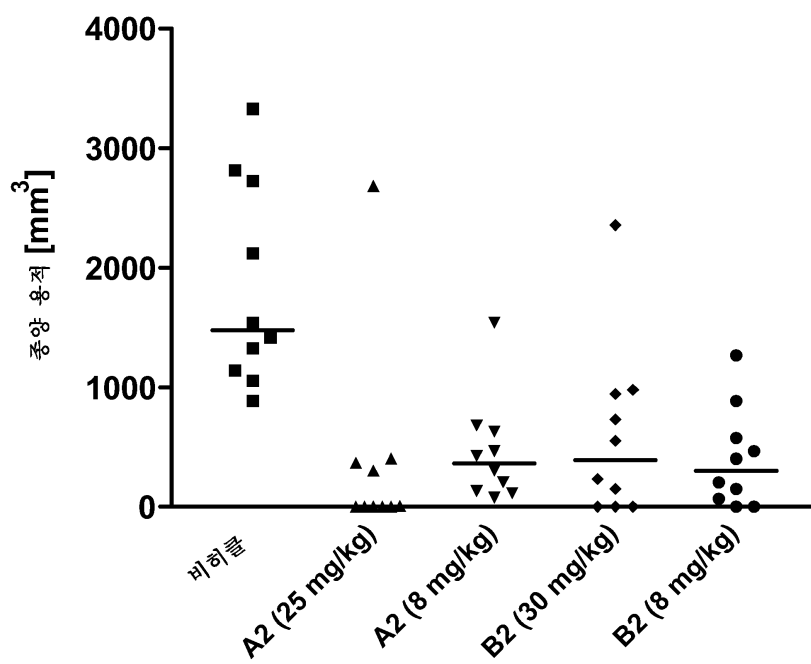
도면12



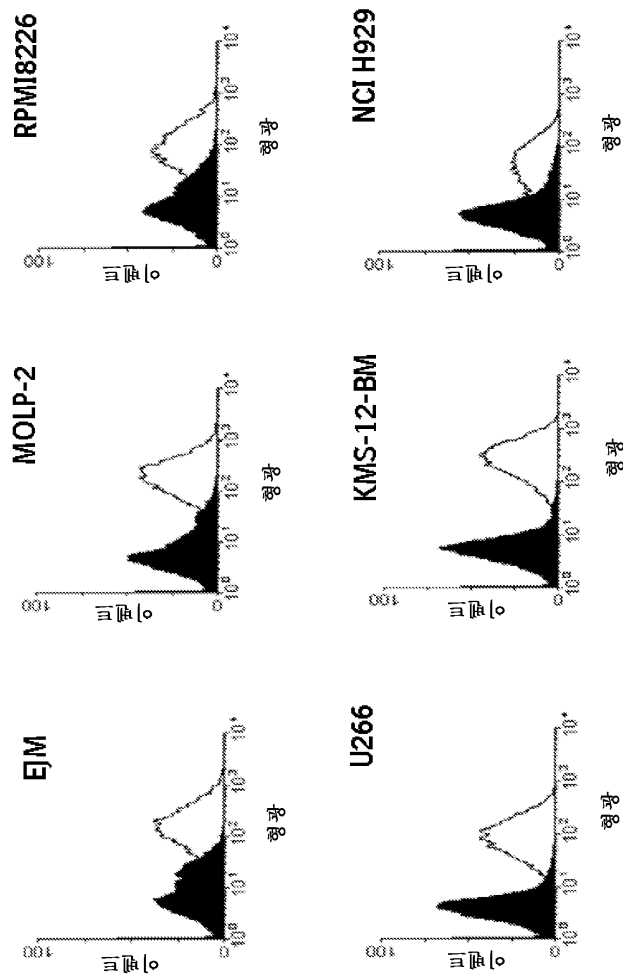
도면13



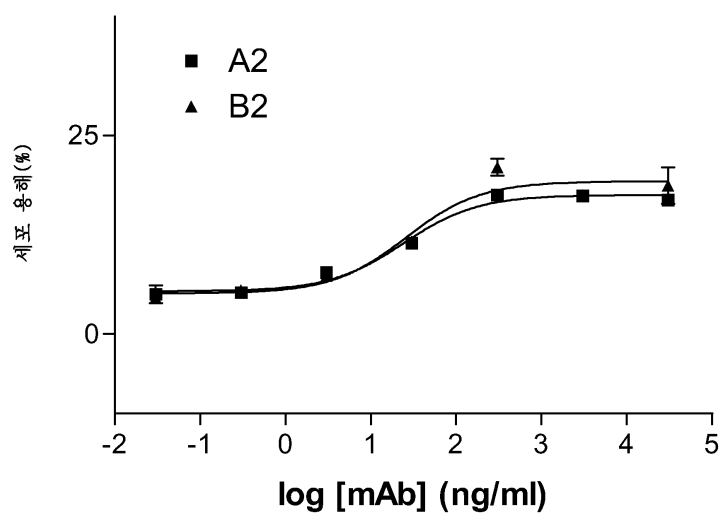
도면14



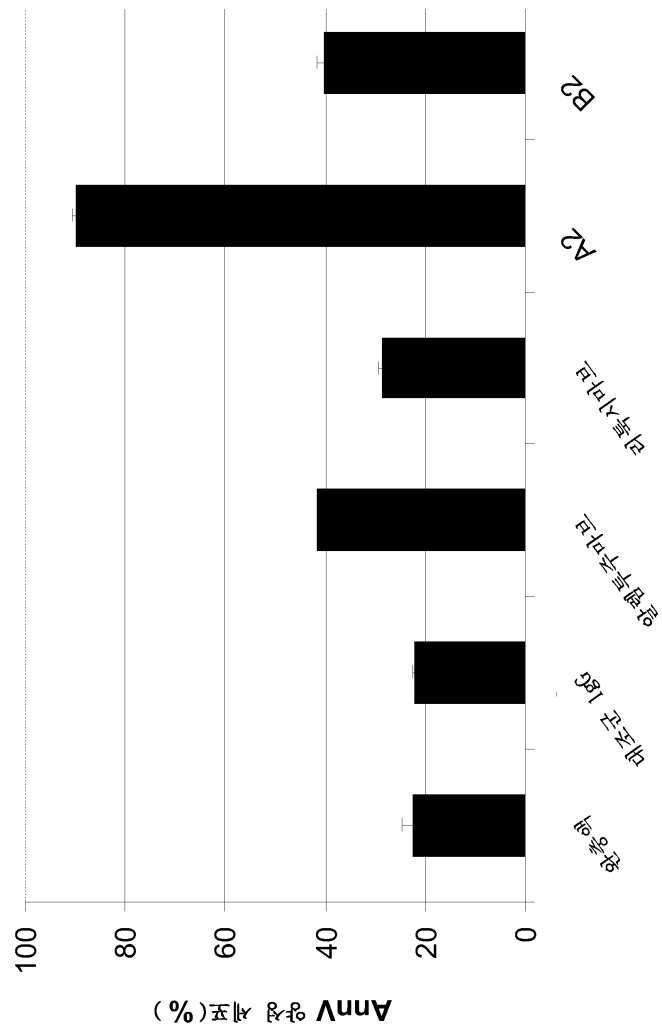
도면15



도면16



도면17



서열 목록

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Anti-CD37 antibodies

<130> 12_0278_PCT

<150> EP 07114128.7

<151> 2007-08-09

<160> 42

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 1

gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct 48

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

1 5 10 15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96

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

20 25 30

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att 144

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc 192

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

50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240

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

65 70 75 80

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288

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

85 90 95

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc 336

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

acc gtc tct tct 348

Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400

> 2

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 3

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat 96
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144

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

tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct 240

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

65 70 75 80

gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg 288

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga 324

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 5

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 5

gcc gtg cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc 48

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

1 5 10 15

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96

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

20 25 30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg 144

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

35 40 45

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192

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

50 55 60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240

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

65 70 75 80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288

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

85 90 95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

acc gtc tct tca 348

Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 7

gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc

48

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

1	5	10	15	
agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac				96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr				
	20	25	30	
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg				144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
	35	40	45	
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc				192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe				
	50	55	60	
aag ggc agg gcc acc ctg agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac				240
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr				
65	70	75	80	
ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc				288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc				336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val				
	100	105	110	
acc gtc tct tca				348
Thr Val Ser Ser				

115

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

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

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

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala 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 Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 9

gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc 48

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

1 5 10 15

agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96

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

20 25 30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg 144

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

35 40 45

gcc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag gtc 192

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

50 55 60

aag ggc agg ttc acc atc agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

acc gtc tct tca 348
Thr Val Ser Ser

115

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 10

Ala 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 Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala 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 Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 11

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48

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

1 5 10 15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144

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

35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192

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

50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240

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

65 70 75 80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324

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

100

105

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

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 Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

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

100 105

<210> 13

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 13

gac atc gtg atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc

48

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

1 5 10 15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg atc 144

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

35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192

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

50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240

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

65 70 75 80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324

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

100 105

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

Asp Ile Val 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 Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 15

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 15

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48

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

1 5 10 15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144

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

35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192

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

50 55 60

agc ggc tcc ggc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240

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

65 70 75 80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95
acc ttc ggc gga ggc acc gag ctg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

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 Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 17

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 17

gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48

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

1 5 10 15

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg 144

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

35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192

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

50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240

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

65 70 75 80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324

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

100 105

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

100 105
<210> 19
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 19
gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc cag gcc ccc aga ctg ctg atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

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

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

<210> 21

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 21

gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48

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

1 5 10 15

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg 144

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

35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192

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

50 55 60

agc ggc tcc ggc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240

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

65 70 75 80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

acc ttc ggc gga ggc acc gag ctg gag atc aaa cgt 324

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

<210> 23

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<

222> (1)..(990)

<400> 23

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48

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

1 5 10 15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192

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

50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240

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

65 70 75 80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc 336

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca 384

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

115 120 125

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc 432

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg 480

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag 528

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg 576

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac 624

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg 672

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag 720

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat 768

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac 816

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc 864

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac 912

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 960

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 990

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 24

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

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

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

180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 25
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(318)
<400> 25

act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 48
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 96

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

20 25 30
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 144
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 192
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 240
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 288
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 318

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1

5

10

15

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

20

25

30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35

40

45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 27

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Fc-engineered chimeric immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(1338)

<400> 27

gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct

48

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

1

5

10

15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96

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

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att 144

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

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc 192

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

50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240

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

65 70 75 80

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288

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

85 90 95

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc 336

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384

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

115 120 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg 432

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc 480

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca 528

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165	170	175	
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg			576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc			624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca			672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc			720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe			
225	230	235	240
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct			768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc			816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca			864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
275	280	285	
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc			912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
290	295	300	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc			960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc			1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330	335	

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca 1056

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 1200

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

385 390 395 400

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248

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

405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 28

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

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

275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 29

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Chimeric immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(642)

<400> 29

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48

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

gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat	96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	
20 25 30	
ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val	
35 40 45	
tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc	192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg	288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	
85 90 95	
acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca	336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc	528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac	576

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

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624

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

ttc aac agg gga gag tgt 642

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

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

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

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

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

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

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu 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>	31		
<211>	1338		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	Fc-engineered chimeric immunoglobulin sequence		
<220><221>	CDS		
<222>	(1)..(1338)		
<400>	31		
gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct		48	
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac		96	
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr			
	20	25	30
aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att		144	
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc		192	
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe			
	50	55	60
aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac		240	

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65			70			75			80							
atg	cag	ctc	aag	agt	ctg	aca	tct	gag	gac	tct	gca	gtc	tat	tac	tgt	288
Met	Gln	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
85			90			95										
gca	aga	tcg	gtc	ggc	cct	atg	gac	tac	tgg	ggg	caa	gga	acc	tca	gtc	336
Ala	Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	
100			105			110										
acc	gtc	tct	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	384
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
115			120			125										
ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	432
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
130			135			140										
gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	480
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145			150			155			160							
gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	528
165			170			175										
gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	576
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
180			185			190										
ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	624
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
195			200			205										
aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	672
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
210			215			220										
tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	gcg	gga	ccg	gat	gtc	ttc	720
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	

225	230	235	240	
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct				768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro				
	245	250	255	
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc				816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val				
	260	265	270	
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca				864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr				
	275	280	285	
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc				912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val				
	290	295	300	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc				960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys				
305	310	315	320	
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc				1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser				
	325	330	335	
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca				1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro				
	340	345	350	
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc				1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val				
	355	360	365	
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg				1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly				
	370	375	380	
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac				1200

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445
<210> 32
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 32
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

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

<210> 33

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Chimeric immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(642)

<400> 33

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48

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

1 5 10 15

gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat 96

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144

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

35 40 45

tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct 240

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
65				70				75				80				
gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg																288
Glu	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	His	Ser	Asp	Asn	Pro	Trp	
				85				90				95				
acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca																336
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
100								105				110				
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga																384
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
115								120				125				
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc																432
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
130								135				140				
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag																480
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
145				150				155				160				
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc																528
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				165				170				175				
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac																576
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
180								185				190				
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc																624
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
195								200				205				
ttc aac agg gga gag tgt																642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys																
210																

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu 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> 35

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Fc-engineered humanized immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(1338)

<400> 35

gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc 48

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

1 5 10 15

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96

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

20 25 30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg 144

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

35 40 45

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192

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

50 55 60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240

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

65 70 75 80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288

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

85 90 95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384

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

115	120	125	
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg	432		
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130	135	140	
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc	480		
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca	528		
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg	576		
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc	624		
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca	672		
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc	720		
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe			
225	230	235	240
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct	768		
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc	816		
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
260	265	270	

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
275 280 285	
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc	912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	
290 295 300	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc	960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
305 310 315 320	
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc	1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser	
325 330 335	
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca	1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
340 345 350	
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc	1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	
355 360 365	
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg	1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	
370 375 380	
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac	1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	
385 390 395 400	
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg	1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	
405 410 415	
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac	1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	
420 425 430	
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa	1338

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 36

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 37

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial

<220><

223> Humanized immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(642)

<400> 37

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48

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

1 5 10 15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144

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

35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192

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

50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240

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

65 70 75 80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca 336

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

100 105 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
ttc aac agg gga gag tgt 642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210
<210> 38
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 38
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 Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

35 40 45
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln 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> 39
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Fc-engineered humanized immunoglobulin sequence
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(1338)
 <400> 39

gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc 48

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

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96

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

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg 144

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

35 40 45

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192

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

50 55 60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240

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

65 70 75 80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288

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

85 90 95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384

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

115 120 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg 432

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc 480

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145	150	155	160	
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca				528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser				
	165	170	175	
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg				576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu				
	180	185	190	
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc				624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr				
	195	200	205	
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca				672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr				
	210	215	220	
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc				720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe				
225	230	235	240	
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct				768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro				
	245	250	255	
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc				816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val				
	260	265	270	
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca				864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr				
	275	280	285	
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc				912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val				
	290	295	300	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc				960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys				
305	310	315	320	

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc 1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca 1056

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 40
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 40
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
115	120	125	
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130	135	140	
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

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

<210> 41

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Humanized immunoglobulin sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(642)

<400> 41

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	
20 25 30	
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	
35 40 45	
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc	192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	
85 90 95	
acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca	336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc	528

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

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576

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

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624

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

ttc aac agg gga gag tgt 642

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 42

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

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 Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser Asp Asn Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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