



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/537 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010105233/10, 15.07.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.07.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.07.2007 US 60/950,088

(43) Дата публикации заявки: 27.08.2011 Бюл. № 24

(45) Опубликовано: 20.07.2015 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US2007207142 A1, 06.09.2007. POLSON
AG, et al. "Antibody-drug conjugates targeted to
CD79 for the treatment of non-Hodgkin
lymphoma", Blood, 2007 Jul 15; 110(2), стр.616-
623. WO2006034488 A2, 30.03.2006. WO0171005
A2, 27.09.2001. US5644033 A, 01.07.1997.
RU2221809 C2, 20.01.2004. РОЙТ и др.
"Иммунология". М.: Мир, 2000, стр.110-111

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.02.2010(86) Заявка РСТ:
US 2008/070061 (15.07.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/012256 (22.01.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, 25, стр.
3, ООО "Юридическая фирма "Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЧЭНЬ, Ивонне (US),
ДЕННИС, Марк (US),
ЭЛКИНС, Кристи (US),
ДЖУНУТУЛА, Джагат Редди (US),
ПОЛСОН, Эндрю (US),
ЧЖЭН, Бин (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD79b И ИММУНОКОНЬЮГАТЫ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. Предложены варианты гуманизированного анти-CD79b антитела, каждый из которых характеризуется наличием легкой и тяжелой цепи и набором 6 CDR с установленной аминокислотной последовательностью. При этом методом *Viacore* определен эпитоп антитела из 11 аминокислот. Рассмотрены: иммуноконъюгат

антитела с лекарственным средством или средством для ингибирования роста клеток, где антитело связано со средством ковалентно, и варианты композиции, на основе эффективного количества иммуноконъюгата или антитела, используемые для ингибирования В-клеточной пролиферации; а также способ определения CD79b в образце с использованием антитела. Описаны:

кодирующий антитело полинуклеотид, а также вектор экспрессии и выделенная клетка, содержащая вектор, для получения антитела. Раскрыты варианты применений антитела или иммуноконъюгата для получения лекарственного средства: для ингибирования роста клеток, экспрессирующих CD79b, для лечения индивидуума, страдающего раком, для лечения

пролиферативного заболевания или для ингибирования В-клеточной пролиферации. Данное изобретение обеспечивает новые антитела, которые могут найти дальнейшее применение в терапии пролиферативных заболеваний, ассоциированных с CD79b. 17 н. и 84 з.п. ф-лы, 8 табл., 9 пр., 20 ил.

R U 2 5 5 7 3 1 9 C 2

R U 2 5 5 7 3 1 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)*C07K* 16/46 (2006.01)*C12N* 5/10 (2006.01)*C12N* 15/63 (2006.01)*A61K* 39/395 (2006.01)*A61K* 31/537 (2006.01)*A61K* 47/48 (2006.01)*A61P* 35/00 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2010105233/10, 15.07.2008

(24) Effective date for property rights:
15.07.2008

Priority:

(30) Convention priority:
16.07.2007 US 60/950,088

(43) Application published: 27.08.2011 Bull. № 24

(45) Date of publication: 20.07.2015 Bull. № 20

(85) Commencement of national phase: 16.02.2010

(86) PCT application:
US 2008/070061 (15.07.2008)(87) PCT publication:
WO 2009/012256 (22.01.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja, 25, str. 3,
OOO "Juridicheskaja firma "Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ChEhN', Ivonne (US),
DENNIS, Mark (US),
EhLKINS, Kristi (US),
DZhUNUTULA, Dzhagat Reddi (US),
POLSON, Ehndrju (US),
ChZhEhN, Bin (US)

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)

(54) **HUMANISED ANTIBODIES AGAINST CD79b AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: claimed invention relates to the field of biotechnology. Claimed are versions of a humanised anti-CD79b antibody, each of which is characterised by the presence of a light and heavy chain and a set of 6 CDR with a determined amino acid sequence. An epitope of the antibody from 11 amino acids is determined by the Biacore method. Disclosed are: an immunoconjugate of the antibody with a medication or means for inhibiting cell growth, where the antibody is bound with means covalently, and versions of the composition, based on an effective quantity of the immunoconjugate or the antibody, used for inhibiting B-cell proliferation; as well as a method of determining

CD79b in a sample with the application of the antibody. Described are: an antibody-coding polynucleotide, as well as an expression vector and an isolated cell, containing the vector for obtaining the antibody. Disclosed are versions of applying the antibody or immunoconjugate for obtaining the medication for inhibiting the growth of CD79b-expressing cells for the treatment of an individual, affected with cancer, for the treatment of proliferative disease or for inhibiting B-cell proliferation.

EFFECT: invention provides novel antibodies, which can find further application in the therapy of proliferative CD79b-associated diseases.

91 cl, 8 tbl, 9 ex, 20 dwg

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

По заявке, не являющейся временной, поданной согласно 37 CFR §1.53(b), испрашивается приоритет согласно 35 USC §119(e) по временной заявке США с серийным номером No. 60/950088, поданной 16 июля 2007 года, которая включена в

5 настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композициям, подходящим для лечения гемопэтической опухоли у млекопитающих, и к способам применения этих композиций.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Злокачественные опухоли (рак) являются второй из ведущих причин смертности в США, после заболеваний сердца (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993)). Злокачественная опухоль характеризуется повышением количества аномальных, или неопластических, клеток, происходящих из нормальной ткани, которые пролиферируют с образованием опухолевой массы, инвазией этих неопластических опухолевых клеток

15 в соседние ткани, и образованием злокачественных клеток, которые в конечном итоге распространяются через кровь или лимфатическую систему в региональные лимфатические узлы и в отдаленные участки в результате процесса, называемого метастазированием. В злокачественном состоянии клетка пролиферирует в условиях, при которых нормальные клетки не растут. Злокачественная опухоль проявляется

20 множеством форм, характеризующихся различными степенями инвазивности и агрессивности.

Злокачественные опухоли, которые вовлекают клетки, образованные в ходе гемопоэза - процесса, посредством которого образуются клеточные элементы крови, такие как лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты, эритроциты и естественные киллеры - называют

25 гемопоэтическими злокачественными опухолями. Лимфоциты, которые могут находиться в крови и лимфатической ткани и являются важными для иммунного ответа, подразделяют на два основных класса лимфоцитов: В-лимфоциты (В-клетки) и Т-лимфоциты (Т-клетки), которые опосредуют гуморальный и клеточно-опосредуемый иммунитет, соответственно.

30 В-клетки созревают в костном мозге и покидают костный мозг, экспрессируя связывающее антиген антитело на их клеточной поверхности. Когда наивная В-клетка впервые встречает антиген, к которому ее мембраносвязанное антитело является специфичным, клетка начинает быстро делиться и ее потомство дифференцируется в В-клетки памяти и эффекторные клетки, называемые "плазматическими клетками". В-

35 клетки памяти обладают большей продолжительностью жизни и продолжают экспрессировать мембраносвязанное антитело с той же специфичностью, что и исходная родительская клетка. Плазматические клетки не продуцируют мембраносвязанное антитело, вместо этого, они продуцируют антитело в форме, которая может секретироваться. Секретируемые антитела являются основной эффекторной молекулой

40 для гуморального иммунитета.

Связанные с В-клетками нарушения включают, но не ограничиваются ими, злокачественную лимфому (неходжкинскую лимфому, NHL), множественную миелому (ММ) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL, В-клеточный лейкоз (CD5+ В-лимфоциты)). Неходжкинские лимфомы (NHL), гетерогенная группа злокачественных

45 опухолей, главным образом, возникающих из В-лимфоцитов, составляют приблизительно 4% от всех вновь диагностируемых опухолей (Jemal, A. et al., CA-Cancer J Clin., 52: 23-47 (2002)). Агрессивная NHL составляет приблизительно 30-40% взрослой NHL (Harris, N.L. et al., Hematol. J., 1:53-66 (2001)) и включает диффузную В-

крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), периферическую Т-клеточную лимфому и анапластическую крупноклеточную лимфому. Комбинированная химиотерапия первой линии обеспечивает излечение менее чем половины пациентов с агрессивной NHL, и большинство пациентов в конечном итоге погибают от этого заболевания (Fischer, R.I., Semin. Oncol., 27 (suppl 12): 2-8 (2000)).

Т-клетки созревают в тимусе, который обеспечивает окружающую среду для пролиферации и дифференцировки незрелых Т-клеток. В ходе созревания Т-клеток, Т-клетки претерпевают реаранжировки генов, в результате которых образуется Т-клеточный рецептор, и положительную и отрицательную селекцию, которая помогает определить фенотип клеточной поверхности зрелой Т-клетки. Характерными маркерами клеточной поверхности зрелых Т-клеток являются комплекс CD3:Т-клеточный рецептор и один из корецепторов, CD4 или CD8.

В попытках найти эффективные клеточные мишени для терапии злокачественных опухолей исследователи проводили поиск в целях идентификации трансмембранных или иным образом ассоциированных с мембраной полипептидов, которые специфично экспрессируются на поверхности одного или нескольких конкретного типа(ов) злокачественных клеток по сравнению с одной или несколькими нормальной незлокачественной клеткой(ами). Часто, такие ассоциированные с мембраной полипептиды в большем количестве экспрессируются на поверхности злокачественных клеток по сравнению с поверхностью незлокачественных клеток. Идентификация таких ассоциированных с опухолью антигенных полипептидов клеточной поверхности обеспечила возможность специфического нацеливания злокачественных клеток на уничтожение посредством терапии на основе антител. В этом отношении, отмечается, что было выяснено, что терапия на основе антител является высоко эффективной при лечении определенных злокачественных опухолей. Например, HERCEPTIN® и RITUXAN® (оба от Genentech Inc., South San Francisco, California) представляют собой антитела, которые успешно используют для лечения рака молочной железы и неходжкинской лимфомы, соответственно. Более конкретно, HERCEPTIN® представляет собой рекомбинантное образованное из ДНК гуманизированное моноклональное антитело, которое селективно связывается с протоонкогеном внеклеточного домена рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER2). Сверхэкспрессия белка HER2 наблюдается в 25-30% случаев первичного рака молочной железы. RITUXAN® представляет собой полученное способами генетической инженерии химерное моноклональное антитело мыши/человека, направленное против антигена CD20, находящегося на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов. Оба эти антитела рекомбинантно продуцируют в клетках CHO.

В других попытках выяснить эффективные клеточные мишени для терапии злокачественной опухоли, исследователи провели поиск, чтобы идентифицировать (1) не ассоциированные с мембраной полипептиды, которые специфично продуцируются одним или несколькими конкретным типом(ами) злокачественной клетки(ок) по сравнению с одним или несколькими конкретным типом(ами) нормальной клетки(ок), (2) полипептиды, которые продуцируются злокачественными клетками на уровне экспрессии, который значимо превышает уровень экспрессии одной или нескольких нормальной незлокачественной клетки(ок), или (3) полипептиды, экспрессия которых по существу ограничивается до только одного (или очень ограниченного количества отличающихся) типа ткани(ей) как в злокачественном, так и в незлокачественном состоянии (например, нормальная ткань предстательной железы и опухолевая ткань предстательной железы). Такие полипептиды могут оставаться

расположенными внутриклеточно или они могут секретироваться злокачественной клеткой. Более того, такие полипептиды могут экспрессироваться не самой злокачественной клеткой, а, вместо этого, клетками, которые продуцируют и/или секретируют полипептиды, обладающие эффектом стимуляции или усиления роста злокачественных клеток. Такие секретируемые полипептиды часто представляют собой белки, которые обеспечивают злокачественным клеткам преимущество при росте относительно нормальных клеток, и включают, например, такие полипептиды как ангиогенные факторы, факторы клеточной адгезии, факторы роста и т.п. Можно ожидать, что идентификация антагонистов таких не ассоциированных с мембраной полипептидов может служить в качестве эффективных лекарственных средств для лечения таких злокачественных опухолей. Более того, идентификация особенностей экспрессии таких полипептидов может быть полезной для диагностики конкретных злокачественных опухолей у млекопитающих.

Несмотря на указанные выше достижения в терапии злокачественных опухолей млекопитающих, существует существенная необходимость в дополнительных лекарственных средствах, способных детектировать наличие опухоли у млекопитающего, и в эффективном ингибировании неопластического роста клеток, соответственно. Таким образом, задачей настоящего изобретения является идентификация полипептидов, ассоциированных с клеточной мембраной, секретируемых или внутриклеточных полипептидов, экспрессия которых специфично ограничена только одним (или очень ограниченным количеством различных) типом(ами) ткани, гемопоэтическими тканями, как в злокачественном, так и в незлокачественном состоянии, и применение этих полипептидов и кодирующих их нуклеиновых кислот для получения композиций, подходящих для медикаментозного лечения и/или детекции гемопоэтической злокачественной опухоли у млекопитающих.

CD79 представляет собой компонент передачи сигнала В-клеточным рецептором, состоящий из ковалентного гетеродимера, содержащего CD79a (Ig α , mb-1) и CD79b (Ig β , B29). Как CD79a, так и CD79b, содержат внеклеточный иммуноглобулиновый домен (Ig), трансмембранный домен, домен внутриклеточной передачи сигнала, домен иммунорецепторного тирозин-связывающего активаторного мотива (ITAM). CD79 экспрессируется на В-клетках и в клетках неходжкинской лимфомы (NHL) (Cabezudo et al., Haematologica, 84:413-418 (1999); D'Arena et al., Am. J. Hematol, 64: 275-281 (2000); Olejniczak et al., Immunol. Invest, 35: 93-114 (2006)). Все из CD79a и CD79b и sIg требуются для экспрессии на поверхности CD79 (Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol, 13(3): 270-7)). Средняя экспрессия на поверхности CD79b на NHL сходна с поверхностной экспрессией на нормальных В-клетках, но ее уровень выше (Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol, 13 (3): 270-7 (2001)).

С учетом экспрессии CD79b, является полезным получение терапевтических антител к антигену CD79b, которые создают минимальную антигенность, или не создают ее, при введении пациентам, особенно при длительном лечении. Настоящее изобретение удовлетворяет эту и другие необходимости. Настоящее изобретение относится к антителам против CD79b, которые преодолевают ограничения современных терапевтических композиций, а также обеспечивают дополнительные преимущества, которые станут очевидными из подробного описания, ниже.

Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), т.е. иммуноконъюгатов, для местной доставки цитотоксических и цитостатических средств, т.е. лекарственных средств для уничтожения или ингибирования опухолевых клеток при лечении злокачественной опухоли (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology

5:543-549; Wu et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26: 151-172; US 4975278) позволяет нацеленную доставку группы лекарственного средства в опухоли, и внутриклеточное накопление в них, где системное введение этих неконъюгированных лекарственных средств может приводить к неприемлемым уровням токсичности в нормальных клетках, помимо опухолевых клеток, подлежащих устранению (Baldwin et al. (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Попытки повысить терапевтический индекс, т.е. максимальную эффективность и минимальную токсичность ADC, сфокусированы на селективности поликлональных (Rowland et al. (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87) и моноклональных антител (mAb), а также на свойствах связывания лекарственных средств и высвобождения лекарственных средств (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549). Группы лекарственных средств, используемые в конъюгатах антитело-лекарственное средство, включают белковые токсины бактерий, такие как дифтерийный токсин, белковые токсины растений, такие как рицин, низкомолекулярные соединения, такие как ауристатин, гелданамицин (Mandler et al. (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), калихеамицин (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342), дауномицин, доксорубин, метотрексат и виндезин (Rowland et al. (1986), выше). Группы лекарственных средств могут влиять на цитотоксические и цитостатические механизмы, включая связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства имеют тенденцию к инактивации или снижению активности при конъюгировании с крупными антителами или белковыми лигандами рецепторов.

Пептиды ауристатина, ауристатин Е (АЕ) и монометилауристатин (ММАЕ), синтетические аналоги доластатина (WO 02/088172), конъюгируют в качестве групп лекарственного средства с: (i) химерными моноклональными антителами сBR96 (специфичными к Lewis Y на карциномах); (ii) сAC10, которое является специфичным к CD30 на гематологических злокачественных опухолях (Klussman, et al. (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773; Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; Francisco et al. (2003) *Blood* 102(4):1458-1465; US 2004/0018194; (iii) антителами против CD20, такими как ритуксан (WO 04/032828) для лечения экспрессирующих CD20 опухолей и иммунных нарушений; (iv) антителом против EphB2R 2H9 для лечения рака ободочной и прямой кишки (Mao et al. (2004) *Cancer Research* 64(3):781-788); (v) антителом против Е-селектина (Bhaskar et al. (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6394); (vi) трастузумабом (HERCEPTIN®, US 2005/0238649), и (vi) антителами против CD30 (WO 03/043583). Варианты ауристатина Е описаны в US 5767237 и US 6124431. Монометилауристатин Е, конъюгированный с моноклональными антителами, описан в Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, представленной 28 марта 2004 года. Аналоги ауристатина MMAE и MMAF конъюгируют с различными антителами (US 2005/0238649).

Общепринятые способы присоединения, т.е. связывания ковалентными связями, группы лекарственного средства с антителом, как правило, приводят к гетерогенной смеси молекул, где группа лекарственного средства связана с несколькими участками

антитела. Например, цитотоксические лекарственные средства, как правило, конъюгируют с антителами через часто многочисленные остатки лизина антитела, с образованием гетерогенной смеси антитело-лекарственное средство. В зависимости от условий реакции, гетерогенная смесь, как правило, содержит антитела с диапазоном

связанных с ним групп лекарственного средства от 0 до 8 или более. Кроме того, в каждой подгруппе конъюгатов с конкретным числовым отношением групп лекарственного средства к антителу находится потенциально гетерогенная смесь, где группа лекарственного средства связана с различными участками антитела. Аналитические и препаративные способы могут быть недостаточными для разделения

и охарактеризации типов молекул конъюгата антитело-лекарственное средство в гетерогенной смеси, полученной при реакции конъюгации. Антитела представляют собой крупные, комплексные и структурно разнообразные биомолекулы, часто со множеством реакционно-способных функциональных групп. Их реакционная способность к линкерным реагентам и промежуточным соединениям лекарственное средство-линкер зависят от таких факторов, как pH, концентрация, концентрация соли и сорастворители. Более того, многостадийный процесс конъюгации может быть невоспроизводимым вследствие трудности контроля условий реакции и охарактеризации реагентов и промежуточных соединений.

Тиольные группы цистеина являются реакционно-способными при нейтральных значениях pH, в отличие от большинства аминов, которые являются протонированными и менее нуклеофильными при pH около 7. Поскольку свободные тиольные (RSH, сульфгидрильные) группы являются относительно реакционно-способными, белки с остатками цистеина часто находятся в окисленной форме в качестве связанных дисульфидом олигомеров или обладают дисульфидными группами со внутренними

мостиками. Внеклеточные белки, как правило, не имеют свободных тиолов (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, page 55). Тиольные группы цистеина антител, как правило, являются более реакционно-способными, т.е. более нуклеофильными, в отношении электрофильных реагентов для конъюгации, чем аминокислотные или гидроксильные группы антитела. Остатки цистеина

встраивали в белки способами генетической инженерии для образования ковалентных связей с лигандами или для образования новых внутримолекулярных дисульфидных связей (Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al. (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; US 6248564). Однако встраивание тиольных групп цистеина путем мутации различных аминокислотных остатков белка на остатки аминокислоты цистеина является потенциально проблематичной, в частности в случае неспаренных (свободных Cys) остатков или остатков, которые являются относительно доступными для реакции или окисления. В концентрированных растворах белка, как в периплазме *E. coli*, так и в культуральных супернатантах, или в частично или полностью очищенном белке, неспаренные остатки Cys на поверхности белка могут образовывать пары и окисляться с образованием межмолекулярных дисульфидов, и, таким образом, димеров или мультимеров белков. Образование дисульфидного димера делает новый Cys нереакционно-способным для конъюгации с лекарственным средством, лигандом или другой меткой. Более того, если белок окислительным путем образует внутримолекулярную дисульфидную связь между вновь конструированным остатком Cys и существующим остатком Cys, обе тиольные группы Cys являются недоступными для участия и взаимодействий в активном центре.

Более того, белок может стать неактивным или неспецифическим вследствие неправильного сворачивания или утраты третичной структуры (Zhang et al. (2002) Anal. Biochem. 311: 1-9).

Антитела со встроенными в них остатками цистеина конструируют в качестве FAB-фрагментов антител (тио-Fab) и экспрессируют в качестве полноразмерных моноклональных антител IgG (тио-Mab) (Junutula, J. R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; US 2007/0092940, содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылок). Антитела тио-Fab и тио-Mab конъюгируют через линкеры на вновь внесенных тиольных группах цистеина с помощью реакционно-способных к тиолу линкерных реагентов и реагентов лекарственное средство-линкер с получением конъюгатов антитело-лекарственное средство (тио-ADC).

Все ссылки, цитированные в настоящем документе, включая патентные заявки и публикации, включены в качестве ссылок в полном объеме.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к антителам против CD79b или их функциональным фрагментам, и к способу их применения для лечения гемопозитических опухолей.

В одном аспекте изобретение относится к антителу, которое связывается, предпочтительно специфично, с любым из описанных выше или ниже полипептидов. Необязательно, антитело представляет собой моноклональное антитело, фрагмент антитела, включая Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагмент, диатело (diabody), однодоменное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое конкурентно ингибирует связывание антитела против полипептида CD79b с его соответствующим антигенным эпитопом. Антитела по настоящему изобретению необязательно можно конъюгировать с ингибирующим рост средством или цитотоксическим средством, таким как токсин, включая, например, ауристатин, майтанзиноид, производное долостатина или калихеамицин, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или сходные с ними. Антитела по настоящему изобретению необязательно можно продуцировать в клетках СНО или в бактериальных клетках, и предпочтительно они индуцируют гибель клетки, с которой они связываются. Для целей детекции, антитела по настоящему изобретению можно метить поддающейся детекции меткой, связывать с твердой подложкой или сходные с ними.

В одном аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где одновалентная аффинность (например, аффинность антитела в виде Fab-фрагмента к CD79b) или аффинность антитела к CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела в виде фрагмента IgG к CD79b) является по существу такой же как, более низкой или более высокой чем, одновалентная аффинность или аффинность в двухвалентной форме, соответственно, антитела мыши (например, аффинность антитела мыши в виде Fab-фрагмента или в виде фрагмента IgG к CD79b) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела в виде Fab-фрагмента или в виде фрагмента IgG к CD79b), содержащему последовательность переменного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14), состоящему или по существу состоящему из них.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела в виде IgG к CD79b) составляет 2,0 нМ.

В одном аспекте предусмотрено антитело, которое связывается с CD79b, где антитело

содержит: (а) по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из группы, состоящей из:

(i) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A16 представляет собой KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:59)

5 (ii) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой LVSKLDS (SEQ ID NO:60)

(iii) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой WQGTNFPYT (SEQ ID NO:61)

10 (iv) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:62)

(v) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO:63) и

(vi) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F6, где F1-F10 представляет собой ARNLYL (SEQ ID NO:64).

15 В одном аспекте предусматривается антитело, которое связывается с CD79b, где антитело содержит по меньшей мере один вариант HVR, где вариант последовательности HVR содержит модификацию по меньшей мере одного остатка последовательности, представленного в SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

20 В одном аспекте изобретение относится к антителу, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:31-33).

В одном аспекте изобретение относится к антителу, содержащему вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:23-25).

25 В одном аспекте изобретение относится к антителу против CD79b, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:16. В другом аспекте изобретение относится к антителу против CD79b, содержащему вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO:12.

30 В одном аспекте изобретение относится к антителу против CD79b со встроенными в него остатками цистеина, содержащему один или несколько остатков аминокислоты цистеина и последовательность, выбранную из SEQ ID NO:91-122. Антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина может связываться с полипептидом CD79b. Антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина можно получать посредством процесса, включающего замену одного или нескольких

35 аминокислотных остатков исходного антитела против CD79b цистеином.

В одном аспекте изобретение относится к антителу против CD79b со встроенными в него остатками цистеина, содержащему один или несколько свободных остатков аминокислоты цистеина, где антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина связывается с полипептидом CD79b и получено путем процесса, включающего

40 замену одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела против CD79b цистеином, где исходное антитело содержит по меньшей мере одну последовательность HVR, выбранную из:

(а) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A16 представляет собой KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:59);

45 (b) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой LVSKLDS (SEQ ID NO:60);

(с) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой WQGTNFPYT (SEQ ID NO:61) или FQGTNFPFT (SEQ ID NO:79);

(d) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:62);

(e) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18 где E1-E18 представляет собой GMIDPSDSETHYNHIFKD(SEQ ID NO:63); и

5 (f) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F6, где F1-F10 представляет собой ARNLYL (SEQ ID NO:64).

Антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина может представлять собой моноклональное антитело, фрагмент антитела, химерное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое
10 конкурентно ингибирует связывание антитела против полипептида CD79b с его соответствующим антигенным эпитопом. Антитела по настоящему изобретению необязательно можно конъюгировать с ингибирующим рост средством или цитотоксическим средством, таким как токсин, включая, например, ауристатин или майтанзиноид. Антитела по настоящему изобретению необязательно можно
15 продуцировать в клетках CHO или бактериальных клетках, и предпочтительно они ингибируют рост или пролиферацию клетки, с которой они связываются, или индуцируют ее гибель. Для диагностических целей, антитела по настоящему изобретению можно метить поддающейся детекции меткой, связывать с твердой подложкой, или сходные с ними.

20 В одном аспекте изобретение относится к способам получения антитела по изобретению. Например, изобретение относится к способу получения антитела против CD79b (которое, как определено в настоящем документе, включает интактное антитело и его фрагменты), причем указанный способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора по изобретению, кодирующего указанное антитело
25 (или его фрагмент), и выделение указанного антитела.

В одном аспекте изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему антитело по изобретению или конъюгат антитело-лекарственное средство по изобретению, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент.

В одном аспекте изобретение относится к изделию, содержащему контейнер; и
30 композиции, находящейся в контейнере, где композиция содержит одно или несколько антител против CD79b по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к набору, содержащему первый контейнер, содержащий композицию, содержащую одно или несколько антител против CD79b по изобретению; и второй контейнер, содержащий буфер.

35 В одном аспекте изобретение относится к применению антитела против CD79b по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение.

В одном аспекте изобретение относится к применению изделия по изобретению для
40 изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение.

В одном аспекте изобретение относится к применению набора по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического
45 лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение.

В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста клетки, которая экспрессирует CD79b, причем указанный способ включает контактирование

указанной клетки с антителом по изобретению, тем самым вызывая ингибирование роста указанной клетки. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

5 В одном аспекте изобретение относится к способу медикаментозного лечения млекопитающего, имеющего злокачественную опухоль, содержащую клетку, которая экспрессирует CD79b, причем указанный способ включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела по изобретению, тем самым эффективно осуществляя лечение указанного млекопитающего. В одном
10 варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения или профилактики клеточно-пролиферативного нарушения, связанного с повышенной экспрессией CD79b, причем указанный способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела по изобретению, тем самым эффективно осуществляя лечение или профилактику указанного клеточно-пролиферативного нарушения. В
15 одном варианте осуществления, указанное пролиферативное нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста клетки, где рост указанной клетки по меньшей мере частично зависит от эффекта CD79b на усиление роста, причем указанный способ включает контактирование клетки с эффективным
25 количеством антитела по изобретению, тем самым ингибируя рост указанной клетки. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу медикаментозного лечения опухоли у млекопитающего, где рост указанной опухоли по меньшей мере частично зависит от
30 эффекта CD79b на усиление роста, причем указанный способ включает контактирование клетки с эффективным количеством антитела по изобретению, тем самым эффективно осуществляя лечение указанной опухоли. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, включающему введение пациенту фармацевтического состава, содержащего иммуноконъюгат, описанный в настоящем документе, приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент.

40 В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования пролиферации В-клеток, включающему воздействие на клетку иммуноконъюгата, содержащего антитело по изобретению, в условиях, позволяющих связывание иммуноконъюгата с CD79b.

В одном аспекте изобретение относится к способу определения наличия CD79b в образце, предположительно содержащем CD79b, причем указанный способ включает
45 воздействие на указанный образец антитела по изобретению, и определение связывания указанного антитела с CD79b в указанном образце, где связывание указанного антитела с CD79b в указанном образце указывает на наличие указанного белка в указанном образце.

В одном аспекте изобретение относится к способу диагностики клеточно-пролиферативного нарушения, связанного с увеличением числа клеток, таких как В-клетки, экспрессирующих CD79b, причем способ включает контактирование тестируемых клеток в биологическом образце с любыми из указанных выше антител; определение
 5 уровня антитела, связавшегося с тестируемыми клетками в образце, путем детекции связывания антитела с CD79b; и сравнение с уровнем антитела, связавшегося с клетками, в контрольном образце, где уровень связавшегося антитела нормализован относительно количества экспрессирующих CD79b клеток в тестируемом и контрольном образцах, и где более высокий уровень антитела, связавшегося с тестируемым образцом по
 10 сравнению с контрольным образцом указывает на наличие клеточно-пролиферативного нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD79b.

В одном аспекте изобретение относится к способу детекции растворимого CD79b в крови или сыворотке, причем способ включает контактирование тестируемого образца крови или сыворотке от млекопитающего, предположительно страдающего В-клеточно-пролиферативным нарушением, с антителом против CD79b по изобретению, и детекцию
 15 повышения растворимого CD79b в тестируемом образце относительно контрольного образца крови или сыворотки от здорового млекопитающего.

В одном аспекте изобретение относится к способу связывания антитела по изобретению с клеткой, которая экспрессирует CD79b, причем указанный способ
 20 включает контактирование указанной клетки с антителом по изобретению. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На фигуре 1 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:1) кДНК PRO36249, где SEQ ID NO:1 представляет собой клон, обозначаемый в настоящем документе как "DNA225786" (также обозначаемый в настоящем документе как "CD79b"). Нуклеотидная последовательность кодирует CD79b, и кодон инициации и стоп-кодон
 25 показаны полужирным шрифтом и подчеркнуты.

На фигуре 2 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:2), образованная кодирующей последовательностью SEQ ID NO:1, представленной на фигуре 1.

На фигуре 3 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:3) легкой цепи химерного 2F2 (ch2F2) IgG1 (2F2 представляет собой моноклональное антитело
 35 мыши против CD79b). Нуклеотидная последовательность кодирует легкую цепь ch2F2, представленную на фигуре 4, и первый кодон (кодирующий первую аминокислоту SEQ ID NO:4) указан полужирным шрифтом и подчеркнут.

На фигуре 4 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:4), образованная кодирующей последовательностью SEQ ID NO:3, представленной на
 40 фигуре 3. Вариабельные области представляют собой не подчеркнутые области.

На фигуре 5 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:5) тяжелой цепи химерного 2F2 (ch2F2) IgG1 (2F2 представляет собой моноклональное антитело мыши против CD79b). Нуклеотидная последовательность кодирует тяжелую цепь ch2F2, представленную на фигуре 6, и первый кодон (кодирующий первую аминокислоту SEQ
 45 ID NO:6) указан полужирным шрифтом и подчеркнут.

На фигуре 6 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:6), образованная кодирующей последовательностью SEQ ID NO:5, представленной на фигуре 5. Вариабельные области представляют собой не подчеркнутые участки.

На фигуре 7 представлено выравнивание последовательностей переменных областей легких цепей для следующих: консенсусная последовательность легкой цепи каппа I человека (обозначенная как "huKI"; SEQ ID NO:9) с VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3, VL-FR4 (SEQ ID NO:65-68, соответственно), антитело 2F2 мыши против CD79b (обозначенное как "mu2F2" и также в настоящем документе обозначаемое как "2F2"; SEQ ID NO:10), "гуманизированное" антитело с пересаженной последовательностью 2F2 (обозначаемое как "hu2F2 с пересаженной последовательностью"; SEQ ID NO:11) и вариант 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (обозначаемый как "hu2F2.D7"; SEQ ID NO:12) (содержащий 71А, 73Т и 78А). Положения пронумерованы согласно Кабат, и гипервариабельные области (HVR), пересаженные из 2F2 мыши в консенсусную каркасную область переменной области легкой цепи каппа I, заключены в рамку.

На фигурах 8А-В представлено выравнивание последовательностей переменных областей тяжелых цепей для следующих: консенсусная последовательность тяжелой цепи подгруппы III человека (обозначенная как "humIII"; SEQ ID NO:13) с VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3 и VH-FR4 (SEQ ID NO:69-72, соответственно), антитело 2F2 мыши против CD79b (обозначенное как "mu2F2" и также в настоящем документе обозначаемое как "2F2"; SEQ ID NO:14), "гуманизированное" антитело с пересаженной последовательностью 2F2 (обозначаемое как "hu2F2 с пересаженной последовательностью"; SEQ ID NO:15) (содержащее 71А, 73Т и 78А) и вариант 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (обозначаемый как "hu2F2.D7"; SEQ ID NO:16) (содержащий 71А, 73Т и 78А). Положения пронумерованы согласно Кабат, и гипервариабельные области (HVR), пересаженные из mu2F2 в консенсусную каркасную область переменной области тяжелой цепи подгруппы III, заключены в рамку.

На фигуре 9 представлена последовательность HVR выбранного варианта "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (SEQ ID NO:18), где вариант обладает множеством изменений аминокислот в отдельной области HVR "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (часть HVR-L3 (SEQ ID NO:61) представлена на фигуре 9 в качестве SEQ ID NO:17). Последовательности переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи вне показанных аминокислотных изменений были идентичны пересаженной последовательности 2F2 и не показаны. Не было выявлено изменений в HVR-L1 (SEQ ID NO:59), HVR-L2 (SEQ ID NO:60), HVR-H1 (SEQ ID NO:62); HVR-H2 (SEQ ID NO:63) или HVR-H3 (SEQ ID NO:64) "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2.

На фигуре 10 представлен анализ Biacore выбранных антител против CD79b, включая антитело ch2F2 (обозначаемое как "ch2F2"), "гуманизированное" антитело с пересаженной последовательностью 2F2 (обозначаемое как "hu2F2 с пересаженной последовательностью" и также обозначаемое в настоящем документе как "2F2 с пересаженной последовательностью"), и вариант 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2.D7) (89F, 96F; SEQ ID NO:18) в отношении обозначенных антигенов, включая внеклеточный домен CD79b человека (huCD79b_{ecd}), внеклеточный домен CD79b человека, слитый с Fc (huCD79b_{ecd}-Fc), и пептид из 16 аминокислот, содержащий эпитоп для 2F2 (16-мерный пептид; SEQ ID NO:78; эпитоп из аминокислот 1-11 SEQ ID NO:78). Не выявленное связывание обозначено на фигуре как "NB".

На фигуре 11А-В (консенсусные каркасные области переменной области тяжелой

цепи (VH)) и на фигуре 12 (консенсусные каркасные области переменной области легкой цепи (VL)) представлены иллюстративные последовательности акцепторных консенсусных каркасных областей человека для применения на практике настоящего изобретения со следующими идентификаторами последовательностей: (фигура 11A-B)

- 5 консенсусная каркасная область VH подгруппы I человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:36), консенсусная каркасная область VH подгруппы I человека без удлиненных гипервариабельных областей (SEQ ID NO:37-39), консенсусная каркасная область VH подгруппы II человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:40), консенсусная каркасная область VH подгруппы II человека без удлиненных гипервариабельных областей (SEQ ID NO:41-43), консенсусная каркасная область VH подгруппы III человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:44), консенсусная каркасная область VH подгруппы III человека без удлиненных гипервариабельных областей (SEQ ID NO:45-47), акцепторная каркасная область VH человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:48), акцепторная каркасная область VH человека без удлиненных гипервариабельных областей (SEQ ID NO:49-50),
- 15 акцепторная каркасная область 2 VH человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:51) и акцепторная каркасная область 2 VH человека без удлиненных гипервариабельных областей (SEQ ID NO:52-54) и (фигура 12) консенсусная каркасная область VL подгруппы I каппа человека (SEQ ID NO:55), консенсусная каркасная область VL подгруппы II каппа человека (SEQ ID NO:56), консенсусная каркасная область VL подгруппы III каппа человека (SEQ ID NO:57) и консенсусная каркасная область VL подгруппы IV каппа человека (SEQ ID NO:58).

На фигуре 13A (легкая цепь) и 13B (тяжелая цепь) показана аминокислотная последовательность антитела по изобретению (2F2.D7). На фигурах 13A (легкая цепь) и 13B (тяжелая цепь) представлены аминокислотные последовательности каркасной области (FR), гипервариабельной области (HVR), первого константного домена (CL или CH1) и Fc-области (Fc) одного из вариантов осуществления антитела по изобретению (hu2F2.D7) (SEQ ID NO:19-26 (фигура 13A) и SEQ ID NO:27-35 (фигура 13B)).

Представлены полноразмерные аминокислотные последовательности (вариабельные и константные участки) легкой и тяжелой цепей 2F2.D7 (SEQ ID NO:89 (фигура 13A) и 90 (фигура 13B) соответственно, и константные домены подчеркнуты. Показаны аминокислотные последовательности вариабельных доменов (SEQ ID NO:12 (фигура 13A для легкой цепи) и SEQ ID NO:16 (фигура 13B для тяжелой цепи)).

На фигуре 14 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей CD79b человека (SEQ ID NO:2), яванского макака (cyno) (SEQ ID NO:7) и мыши (SEQ ID NO:8). CD79b человека и яванского макака обладают 85% аминокислотной идентичностью. Указаны сигнальная последовательность, тестируемый пептид (эпитоп из 11 аминокислот для антитела 2F2, описанный в примере 1; аминокислоты 1-11 (ARSEDYRNPK) SEQ ID NO:78), трансмембранный (TM) домен и домен иммунорецепторного связывающего тирозин активационного мотива (ITAM). Область, заключенная в рамку, представляет собой область CD79b, которая отсутствует в варианте по сплайсингу CD79b (описанном в примере 1).

На фигуре 15 представлено изображение конъюгатов антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства (ADC), где группа лекарственного средства связана со встроенной группой цистеина в: легкой цепи (LC-ADC); тяжелой цепи (HC-ADC); и Fc-области (Fc-ADC).

На фигуре 16 представлены стадии: (i) восстановление аддуктов дисульфида цистеина и межцепочечных и внутрицепочечных дисульфидов в антителе против CD79b со встроенными в него остатками цистеина (тио-Mab) восстановителем TCEP (трис(2-

карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид); (ii) частичное окисление, т.е. повторное окисление для преобразования межцепочечных и внутрицепочечных дисульфидов, посредством dhAA (дегидроаскорбиновой кислоты); и (iii) конъюгация повторно окисленного антитела с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер с образованием конъюгата антитела против CD79b со встроенными остатками цистеина и лекарственного средства (ADC).

На фигуре 17 представлена (A) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO:86) и (B) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO:85) гуманизированного антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина (thio-hu2F2.D7-HC-A118C), в котором аланин в положении 118 по EU (положение аланина по последовательности 118; положение по Кабат 114) тяжелой цепи заменен на цистеин. Группа лекарственного средства может быть связана со встроенной группой цистеина в тяжелой цепи. На каждой фигуре измененная аминокислота представлена полужирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Однократным подчеркиванием показаны константные области. Вариабельные области представляют собой не подчеркнутые области. Fc-область обозначена курсивом. "Тео" относится к антителу со встроенным в него цистеином, а "hu" относится к гуманизированному антителу.

На фигуре 18 представлены (A) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO:88) и (B) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO:87) антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина (Thio-hu2F2.D7-LC-V205C), в котором валин в положении 205 по Кабат (положение в последовательности: валин 210) легкой цепи заменен цистеином. Аминокислота D в положении 6 по EU (закрашена на фигуре) тяжелой цепи альтернативно может представлять собой E. Группа лекарственного средства может быть связана со встроенной группой цистеина в тяжелой цепи. На каждой фигуре измененная аминокислота показана полужирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Однократным подчеркиванием указаны константные области. Вариабельные области представляют собой не подчеркнутые области. Fc-область обозначена курсивом. "Тео" относится к антителу со встроенными в него остатками цистеина.

На фигуре 19 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* в модели с ксенотрансплантацией BJAB-люцифераза, который демонстрирует, что введение антител против CD79b ((a) ch2F2-SMCC-DM1, нагрузка лекарственным средством составляла приблизительно 3 (таблица 7) и (b) hu2F2.D7-SMCC-DM1, нагрузка лекарственным средством составляла приблизительно 2,3 (таблица 7)), мышам SCID, имеющим В-клеточные опухоли человека, значительно ингибировало рост опухоли. Контроли включали HERCEPTIN® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (антитело против HER2-SMCC-DM1). "hu" относится к гуманизированному антителу и "ch" относится к химерному антителу.

На фигуре 20A представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* в модели с ксенотрансплантатом Granta-519 (лимфома из клеток мантийной зоны человека), на котором показано, что введение антитела против CD79b, hu2F2.D7-SMCC-DM1, нагрузка лекарственным средством составляла приблизительно 2,8 (таблица 8), мышам SCID, имеющим В-клеточные опухоли человека, значительно ингибировало рост опухоли. Контроли включали HERCEPTIN® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (антитело против HER2-SMCC-DM1). На фигуре 20B представлен график процентного изменения массы мышей в исследовании с ксенотрансплантатом Granta-519 (фигура 20A и таблица 8), на котором показано, что отсутствуют значительные изменения массы в течение первых 7 суток исследования, "hu" относится к гуманизированному антителу.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ

ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам, композициям, наборам и изделиям для идентификации композиций, подходящих для лечения гематопоэтических опухолей у млекопитающих, и к способам применения указанных композиций.

5 В настоящем документе представлены детали этих способов, композиций, наборов и изделий.

I. Общие способы

В практике настоящего изобретения используют, если нет иных указаний, обычные способы молекулярной биологии (включая рекомбинантные способы), микробиологии, 10 клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области. Такие способы полностью описаны в литературе, такой как, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", второе издание (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel 15 et al., eds., 1987, и периодические дополненные издания); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

II. Определения

Для целей разъяснения рассматриваемого описания, будут использованы следующие 20 определения, и там, где это необходимо, термины, указанные в единственном числе, также включают множественное число, и наоборот. В том случае, если представленные далее определения противоречат любому документу, включенному в настоящий документ в качестве ссылки, следует руководствоваться определениями, представленными в настоящем документе.

25 Термины "маркер В-клеточной поверхности" или "антиген В-клеточной поверхности" в настоящем документе обозначают антиген, экспрессируемый на поверхности В-клетки, на который может быть нацелен антагонист, который с ним связывается, включая, но не ограничиваясь ими, антитела к антигену В-клеточной поверхности или растворимую форму антигена В-клеточной поверхности, способные осуществлять антагонизм 30 связывания лиганда с природным антигеном В-клетки. Примеры маркеров В-клеточной поверхности включают маркеры поверхности лейкоцитов CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 и CD86 (для описания см. The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt 35 Brace & Co., New York). Другие маркеры В-клеточной поверхности включают RP105, FcRH2, CR2 В-клетки, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, и 239287. Представляющий особый интерес маркер В-клеточной поверхности экспрессируется предпочтительно на В-клетках, по сравнению с другими не В-клеточными тканями 40 млекопитающих, и он может экспрессироваться как на предшественнике В-клеток, так и на зрелых В-клетках.

Термин "CD79b", как используют в настоящем документе, относится к любому нативному CD79b любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например люди, яванские макаки (супо)) и грызуны (например, мыши и 45 крысы), если нет иных указаний. CD79b человека также обозначают в настоящем документе как "PRO36249" (SEQ ID NO:2) и он кодируется нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO:1), которую также обозначают в настоящем документе как "DNA225786". Термин "CD79b" включает "полноразмерное" непротессированное

CD79b, а также любую форму CD79b, которая образуется в результате процессинга в клетке. Термин также включает встречающиеся в природе варианты CD79b, например, вариант по сплайсингу, аллельные варианты и изоформы. Полипептиды CD79b, описанные в настоящем документе, можно выделять из различных источников, например, из тканей человека или из других источников, или получать, используя рекомбинантные или синтетические способы. Термин "полипептид CD79b с нативной последовательностью" включает полипептид с такой же последовательностью аминокислот, как и у соответствующего полипептида CD79b, полученного из природного источника. Такие полипептиды CD79b с нативными последовательностями можно выделять из природных источников или можно получать, используя рекомбинантные или синтетические способы. Термин "полипептид CD79b с нативной последовательностью" конкретно включает встречающиеся в природе укороченные или секретируемые формы конкретного полипептида CD79b (например, внеклеточную последовательность домена), формы встречающихся в природе вариантов (например, альтернативно сплайсированные формы) и встречающиеся в природе аллельные варианты полипептида. В некоторых вариантах настоящего изобретения, полипептиды CD79b с природными последовательностями, описанные в настоящем документе, являются зрелыми или полноразмерными полипептидами с нативной последовательностью, включающими полноразмерные последовательности аминокислот, представленными на прилагаемых рисунках. Кодон инициации и стоп кодон (если указаны) указаны полужирным шрифтом и подчеркнуты на рисунках. Остатки нуклеиновой кислоты, обозначаемые как "N" на прилагаемых рисунках представляют собой любые остатки нуклеиновых кислот. Однако хотя на прилагаемых рисунках показано, что описанные полипептиды CD79b начинаются с остатков метионина, обозначенных в настоящем документе как аминокислотное положение 1 на рисунках, вероятно и возможно, что в качестве начального аминокислотного остатка для полипептидов CD79b можно использовать другие остатки метионина, расположенные либо выше, либо ниже, от положения аминокислоты 1 на рисунках.

Термин "2F2" используют в настоящем документе для обозначения моноклонального антитела мыши против CD79b (также обозначаемого в настоящем документе как "mu2F2" или "2F2" мыши) или химерного антитела (также обозначаемого в настоящем документе как "ch2F2").

Термины "mu2F2" или "2F2 мыши" используют в настоящем документе для обозначения моноклонального антитела мыши против CD79b, где антитело мыши включает переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:10 (фиг. 7) и переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:14 (фиг. 8A-B). Mu2F2 можно получать из гибридом, депонированных в ATCC в качестве РТА-7712 11 июля 2006 года.

Термин "ch2F2" или "химерное антитело 2F2" используют в настоящем документе для обозначения химерного антитела (как ранее описано в патентной заявке США Ser. No. 11/462336, поданной 3 августа 2006 года), где химерное антитело включает легкую цепь SEQ ID NO:4 (фиг. 4), где указанная легкая цепь включает переменный домен SEQ ID NO:10 (фиг. 7) и легкую цепь константного домена IgG1 человека. Химерное антитело далее включает тяжелую цепь SEQ ID NO:6 (фиг. 6), где легкая цепь включает переменный домен SEQ ID NO:14 (фиг. 8A-B) и константный домен тяжелой цепи IgG1 человека.

Термины "пересаженная последовательность 2F2" или "гуманизированное" антитело с пересаженной последовательностью 2F2" или "пересаженная последовательность hu2F2" используют в настоящем документе для обозначения конкретно пересаженной

последовательности, полученной пересадкой гипервариабельных областей из антитела 2F2 мыши (mu2F2) в акцепторную консенсусную VL каппа I человека (huKI) и консенсусную VH подгруппы III человека (huIII) с R71A, N73T и L78A (Carter et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)) (см. пример 1A и фигуры 7 (SEQ ID NO:11) и 8 (SEQ ID NO:15)).

Термин "модификация" аминокислотного остатка/положения, как используют в настоящем документе, относится к изменению первичной аминокислотной последовательности по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью, где указанное изменение происходит в результате изменения последовательности, вовлекающего указанные аминокислотные остатки/положения. Например, типичные модификации включают замену остатка (или в указанном положении) другой аминокислотой (например, консервативную или неконсервативную замену), вставку одной или более (обычно менее 5 или 3) аминокислот, соседних с указанным остатком/положением и делецию указанного остатка/положения. Термин "аминокислотная замена", или его вариации, относится к замене существующего аминокислотного остатка в заданной (исходной) аминокислотной последовательности отличающимся аминокислотным остатком. Обычно и предпочтительно, результатом модификации является изменение по меньшей мере одного вида физико-биохимической активности варианта полипептида по сравнению с полипептидом, содержащим исходную аминокислотную последовательность (или аминокислотную последовательность "дикого типа"). Например, в случае антитела, физико-биохимическая активность, которая изменяется, может представлять собой аффинность связывания, связывающую способность и/или эффект связывания в отношении молекулы-мишени.

Термин "антитело" используют в наиболее широком смысле и, конкретно, он охватывает, например, отдельные моноклональные антитела против CD79b (включая агонистические, антагонистические, нейтрализующие, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител против CD79b с полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, поливалентные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечные антитела против CD79b и фрагменты антител против CD79b (см. ниже), включая Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, диатела, одноцепочечные антитела (sdAb) при условии, что они проявляют требуемую биологическую или иммунологическую активность. В настоящем документе термины "иммуноглобулин" (Ig) и "антитело" используют взаимозаменяемо. Антитело может быть антителом человека, гуманизированным антителом и/или антителом с созревшей аффинностью.

Термин "антитело против CD79b" или "антитело, которое связывается с CD79b" относится к антителу, которое способно связывать CD79b с достаточной аффинностью, так что антитело является подходящим в качестве диагностического и/или лекарственного средства при нацеливании на CD79b. Предпочтительно, степень связывания антитела против CD79b с неродственным не CD79b-белком составляет менее чем приблизительно 10% от связывания антитела с CD79b при измерении, например, радиоиммунным анализом (RIA). В определенных вариантах осуществления, антитело, которое связывается с CD79b, имеет константу диссоциации (K_d) ≤1 мкМ, ≤100 нМ, ≤10 нМ, ≤1 нМ или ≤0,1 нМ. В определенных вариантах осуществления, антитело против CD79b связывается с эпитопом CD79b, который является консервативным среди CD79b из различных видов.

"Выделенное антитело" представляет собой антитело, которое идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его естественных окружающих условий. Загрязняющие компоненты его естественных окружающих условий представляют собой вещества, которые препятствуют терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело является очищенным (1) до более чем 95% по массе антитела, как определяют способом Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси синего или, предпочтительно, окрашивания серебром. Выделенное антитело включает антитело в рекомбинантных клетках *in situ*, поскольку в этом случае отсутствует по меньшей мере один компонент условий естественного окружения антитела. Однако, как правило, выделенное антитело получают посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

Основной элемент антитела из 4-цепей представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных элементов вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, таким образом, оно содержит 10 антиген-связывающих участков, в то время как секретируемые антитела IgA могут полимеризоваться с образованием поливалентных систем, содержащих 2-5 основных элементов из 4-цепей вместе с J-цепью). В случае IgG, элемент из 4-цепей, как правило, имеет массу 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями, в зависимости от изотипа H-цепи. Каждая H- и L-цепь имеет расположенные с равными интервалами межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь имеет на N-конце переменный домен (V_H), за которым следуют три константных домена (C_H) для каждой из α - и γ -цепей и четыре C_H -домена для изотипов μ и ϵ . Каждая L-цепь имеет на N-конце переменный домен (V_L), за которым следует константный домен (C_L) на ее другом конце. V_L выравнивается с V_H и C_L выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (C_H1). Полагают, что конкретные аминокислотные остатки образуют поверхность контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Образование пары V_H и V_L формирует один антиген-связывающий участок. Для структуры и свойств различных классов антител, см., например, Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

L-цепь любых видов позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко отличающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (C_H), иммуноглобулины можно отнести к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначаемые как α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α далее подразделяются на подклассы на основе относительно небольших различий в последовательности C_H и функции,

например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

"Вариабельный участок" или "вариабельный домен" антитела относится к N-концевым доменам тяжелой и легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может быть обозначен как "VH". Вариабельный домен легкой цепи может быть обозначен как "VL". Эти домены, как правило, являются наиболее вариабельными частями антитела и содержат антиген-связывающие центры.

Термин "вариабельный" относится к тому факту, что последовательности определенных сегментов вариабельных доменов значительно отличаются среди антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность не является равномерной на протяжении участка вариабельных доменов из 110 аминокислот. Вместо этого, V-участки состоят из относительно инвариантных участков, называемых каркасными областями (FR), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками высокой вариабельности, называемыми "гипервариабельными областями", длина которых составляет 9-12 аминокислот. Вариабельные домены нативных тяжелых и легких цепей содержат четыре FR, главным образом, приминающих конфигурацию β -слоев, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые формируют петли, объединяющие структуру β -слоев, и, в некоторых случаях, формирующие ее часть. Гипервариабельные области в каждой цепи расположены вместе в непосредственной близости от FR и, совместно с гипервариабельными областями другой цепи, участвуют в формировании антиген-связывающего центра антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но они проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

"Интактное" антитело представляет собой антитело, которое содержит антиген-связывающий центр, а также C_L и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены человека с нативной последовательностью) или их вариант по аминокислотной последовательности. Предпочтительно, интактное антитело обладает одной или несколькими эффекторными функциями.

"Голое" антитело для целей настоящего описания представляет собой антитело, которое не конъюгировано с цитотоксической группой или радиоактивной меткой.

"Фрагменты антитела" содержат часть интактного антитела, предпочтительно антиген-связывающую или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, диатела, линейные антитела (см., например, патент США No. 5641870, пример 2, Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 [1995]); одноцепочечные молекулы антител; и полиспецифические антитела, образованные фрагментами антител. В одном варианте осуществления, фрагмент антитела содержит антиген-связывающий центр интактного антитела и, таким образом, сохраняет способность связывать антиген.

Расщепление антител папаином приводит к образованию двух идентичных антиген-связывающих фрагментов, называемых "Fab"-фрагментами, и остаточного "Fc"-фрагмента, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из целой L-цепи вместе с доменом вариабельного участка H-цепи

(V_H), и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_H1). Каждый Fab-фрагмент является одновалентным в отношении связывания антигена, т.е., он обладает одним антиген-связывающим участком. Обработка антитела пепсином приводит к одному крупному F(ab')₂-фрагменту, который приблизительно соответствует двум связанным дисульфидом Fab-фрагментам, имеющим двухвалентную антиген-связывающую активность, и, кроме того, способен к перекрестному связыванию антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием дополнительных нескольких остатков на С-конце домена C_H1, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение для Fab', в котором остаток (ки) цистеина константных доменов обладает свободной тиольной группой. F(ab')₂-фрагменты антитела исходно были получены в качестве пар Fab'-фрагментов, которые обладают шарнирными цистеинами между ними. Также известно другое химическое связывание фрагментов антител.

Fc-фрагмент содержит С-концевые части обеих Н-цепей, удерживаемые вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями Fc-участка, который также является частью, распознаваемой Fc-рецепторами (FcR), встречающимися на определенных типах клеток.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антиген-связывающий центр. Этот фрагмент состоит из димера, состоящего из одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, связанных прочной нековалентной связью. В одноцепочечных типах Fv (scFv), один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны подвижным пептидным линкером, так чтобы легкая и тяжелая цепи могли ассоциировать в "димерные" структурные аналоги, аналогичные двухцепочечным типам Fv. Сворачивание этих двух доменов образует шесть гипервариабельных петель (3 петли в каждой из Н- и L-цепи), которые предоставляют аминокислотные остатки для связывания антигена и обеспечивают специфичность связывания антигена антителом. Однако, даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый участок связывания.

"Одноцепочечные Fv", также сокращаемые как "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат V_H и V_L-домены антитела, соединенные в единую полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv также необязательно содержит полипептидный линкер между V_H и V_L-доменами, которые обеспечивают возможность формирования в sFv структуры, требуемой для связывания антигена. Для обзора sFv, см. Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, ниже.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антитела с двумя антиген-связывающими участками, причем эти фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), связанный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной полипептидной цепи (V_H-V_L). Небольшие фрагменты антител получают конструированием sFv-фрагментов (см. предыдущий абзац) с короткими линкерами (приблизительно 5-10 остатков) между V_H- и V_L-доменами, так что обеспечивается межцепочечное, но не внутрицепочечное, образование пар V-доменов, что приводит к двухвалентному фрагменту, т.е., фрагменту, обладающему двумя антиген-связывающими центрами. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Биспецифические

диатела представляют собой гетеродимеры из двух "пересекающихся" sFv-фрагментов, в которых V_H - и V_L -домены двух антител находятся на различных полипептидных цепях. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO93/11161; Hudson et al., (2003) Nat. Med. 9:129-134; и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993). Триатела (triabody) и тетратела (tetrabody) также описаны в Hudson et al., (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Как используют в настоящем документе, термин "моноклональное антитело" относится к антителу из совокупности по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие совокупность, являются идентичными, за исключением возможных мутаций, например, встречающихся в природе мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высоко специфичными и направлены против одного антигенного участка. Более того, в противоположность препаратам поликлональных антител, которые включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, препараты моноклонального антитела являются преимущественными в том, что их можно синтезировать без примесей других антител. Определение "моноклональный" не подразумевает того, что антитело должно быть получено каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, предназначенные для применения в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены способом гибридом, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или они могут быть получены способами рекомбинантных ДНК бактериальных, эукариотических клетках, а также в клетках животных и растений (см., например, патент США No. 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть получены из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных, например, в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991).

Моноклональные антитела в настоящем документе конкретно включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как оставшаяся часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (патент США No 4816567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81:6851-6855 (1984)). Представляющие интерес в рамках настоящей заявки химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антиген-связывающие последовательности варибельного домена не относящегося к человеку примата (например, старосветской мартышки, обезьяны и т.д.) и последовательности константного домена человека.

"Гуманизированные" формы, не являющихся человеческими антител (например, грызунов), представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. В основном, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гиперварибельной области реципиента заменены остатками из гиперварибельной области видов, не относящихся к человеку, (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или не относящиеся к человеку приматы, которые обладают требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях, остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина

человека заменяют соответствующими остатками, не являющиеся человеческими. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации проводят для дополнительного улучшения параметров антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит по существу все по меньшей мере из одного, и, как правило, из двух, 5
вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все FR-области представляют собой FR-области из последовательности иммуноглобулина человека. Также гуманизированное антитело 10
необязательно содержит по меньшей мере участок константного домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, константного домена иммуноглобулина человека. Для более подробной информации см. Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Также см. следующие обзорные статьи и ссылки, цитированные в них: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

"Тео", при использовании в настоящем документе, относится к антителу со встроенными в него остатками цистеина, а "hu", при использовании в настоящем документе, относится к гуманизированному антителу.

"Антитело человека" представляет собой антитело, которое содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемой у человека и/или полученной с использованием любых способов получения антител человека, как описано в настоящем документе. Это определение антитела человека, в частности, не включает гуманизированное антитело, содержащее 25
антиген-связывающие остатки не человека. Антитела человека можно получать с использованием различных способов, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Также для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 30
р. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991). Также см. van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем введения антигена трансгенному животному, модифицированному для продукции таких антител в ответ на нагрузку антигеном, но имеющему поврежденные эндогенные локусы, например, иммунизированным ксеномышам (см., например, патенты США 35
No. 6075181 и 6150584 в отношении технологии XENOMOUSETM). Также см., например, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) в отношении антител человека, полученных технологией В-клеточных гибридом человека.

Термины "гипервариабельная область", "HVR", или "HV", как используют в настоящем документе, относятся к участкам вариабельного домена антитела, которые являются 40
гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Обычно антитела включают шесть гипервариабельных областей: три в VH (H1, H2, H3), и три в VL (L1, L2, L3). Используют несколько способов обозначения гипервариабельных областей, и они включены в рассматриваемое описание. Определяющие комплементарность области (CDR) по Кабат, основаны на 45
вариабельности последовательностей и используются наиболее часто (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia вместо этого ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-

H1 по Chothia, при нумерации с использованием правила нумерации Кабат, варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это происходит из-за того, что схема нумерации Кабат помещает вставки у H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B, не присутствуют, петля кончается у 32; если присутствует только 35A, петля кончается у 33; если присутствуют и 35A и 35B, тогда петля кончается у 34). Гипервариабельные области AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями по Chothia, и они используются в программном обеспечении моделирования антител Oxford Molecular's AbM. "Контактные" гипервариабельные участки основаны на анализе доступных комплексных кристаллических структур. Остатки из каждого из указанных гипервариабельных участков отмечены далее.

Петля	Кабат	AbM	Chothia	Контакт
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34	H30-H35B
(Нумерация по Кабат)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерация по Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Гипервариабельные участки могут включать следующие "удлиненные" гипервариабельные участки: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL и 26-35B (H1), 50-65, 47-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки вариабельных доменов пронумерованы согласно Кабат (Kabat et al., выше) для каждого из этих определений.

"Каркасные" остатки или "FR" являются остатками вариабельных доменов, не относящихся к остаткам гипервариабельной области, как определено в настоящем описании.

Термины "нумерация остатка вариабельного домена по Кабат" или "нумерация аминокислотного положения по Кабат", и их варианты, относятся к системе нумерации, которую используют для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи в совокупности антител из Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). С использованием этой системы нумерации, истинная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительное количество аминокислот, что соответствует укорочению FR или CDR вариабельного домена или встраиванию в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать одну вставку представляющей интерес аминокислоты (остаток 52a по Кабат) после остатка 52 в H2 и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b, и 82c, и т.д. по Кабат) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию Кабат для остатков можно определить для конкретного антитела путем выравнивания по участкам гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью с нумерацией по Кабат.

Систему нумерации Кабат обычно используют при указании на остаток в вариабельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Систему нумерации EU" или "индекс EU" обычно используют при указании на остаток в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, указанный в Kabat et al., выше).

"Индекс EU по Кабат" относится к нумерации остатков антитела IgG1 человека EU. Если в настоящем документе нет иных указаний, указания на номера остатков в переменных доменах антител означают нумерацию остатков в соответствии с системой нумерации Кабат. Если в настоящем документе нет иных указаний, указания на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков в соответствии с системой нумерации EU. (например, см. предварительную заявку США No. 60/640323, фигуры для нумерации EU).

Антитело, полученное "созреванием аффинности" представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его HVR, которые приводят к повышению аффинности антитела к антигену, по сравнению с исходным антителом, которое не имеет этого изменения(ий). Предпочтительные антитела, полученные "созреванием аффинности", имеют наномолярную или даже пикомолярную аффинность к антигену-мишени. Антитела, полученные созреванием аффинности, получают способами, известными в данной области. В Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) описано созревание аффинности способом "перетасовки" VH- и VL-доменов. Случайный мутагенез HVR и/или каркасных остатков описан: Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Блокирующее антитело" или "антитело-антагонист" представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который оно связывает. Предпочтительные блокирующие антитела или антитела-антагонисты частично или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

"Антитело-агонист", как используют в настоящем документе, представляет собой антитело, которое имитирует по меньшей мере один из функциональных видов активности представляющего интерес полипептида.

"Зависимое от вида антитело", например, антитело млекопитающего против IgE человека, представляет собой антитело, которое обладает более высокой аффинностью связывания с антигеном из образца первого вида млекопитающего, относительно аффинности связывания с гомологом указанного антигена из образца второго вида млекопитающего. Обычно зависимое от вида антитело "специфично связывается" с антигеном человека (то есть, обладает величиной аффинности связывания (K_d) не более чем приблизительно 1×10^{-7} М, предпочтительно не более чем приблизительно 1×10^{-8} и наиболее предпочтительно не более чем приблизительно 1×10^{-9} М), но обладает аффинностью связывания с гомологом антигена из второго, не относящегося к человеку, вида млекопитающего, которая по меньшей мере приблизительно в 50 раз, или по меньшей мере приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз слабее, чем его аффинность связывания с антигеном человека. Зависимое от вида антитело может быть любым из различных типов антител, как раскрыто выше, но, предпочтительно, является гуманизированным антителом или антителом человека.

Термин "аффинность связывания" обычно относится к силе всех суммарных нековалентных взаимодействий между отдельным участком связывания молекулы (например, антитела) и его связывающим партнером (например, антигеном). Если нет иных указаний, как используют в настоящем документе, "аффинность связывания" относится к присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно обычно представить константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерять обычными способами, известными в данной области,

включая способы, описанные в настоящем документе. Низкоаффинные антитела обычно связывают антиген медленно, и имеют тенденцию к легкой диссоциации, тогда как высокоаффинные антитела обычно связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться дольше в связанном состоянии. Специалистам известны различные способы измерения аффинности связывания, причем любой из них можно использовать для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты осуществления описаны далее.

Выражение "или лучше", когда его используют в настоящем документе, при указании на аффинность связывания, относится к более сильному связыванию между молекулой и ее связывающим партнером. "Или лучше", когда его используют в настоящем документе, относится к более сильному связыванию, характеризующемуся более низким числовым значением K_d . Например, в случае антитела, аффинность которого к антигену составляет "0,6 нМ или лучше", аффинность антитела к антигену составляет $<0,6$ нМ, то есть 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ и т.д., или любую величину, которая меньше чем 0,6 нМ.

В одном варианте " K_d " или "величину K_d " в соответствии с настоящим изобретением измеряют с помощью анализа связывания меченного радиоактивной меткой антигена (RIA), проводимого с Fab-версией представляющего интерес антитела и его антигеном, как описано в следующем анализе, в котором измеряют аффинность связывания Fab с антигеном в растворе путем уравнивания Fab минимальной концентрацией (^{125}I)-меченного антигена в присутствии серии титров немеченного антигена, с последующей фиксацией связанного антигена на планшете, покрытом антителом против Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881). Чтобы установить условия для анализа, на микропланшеты для титрования (Dynex) наносят в течение ночи 5 мкг/мл фиксирующего антитела против Fab (Cappel Labs) в 50 мМ растворе карбоната натрия (pH 9,6), а затем блокируют с использованием 2% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение от двух до пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В не адсорбирующем планшете (Nunc #269620), 100 пМ или 26 пМ [^{125}I]-антигена смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, в соответствии с антителом против VEGF, Fab-12, в Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако, инкубацию можно продолжать в течение более длительного периода (например, 65 часов), чтобы убедиться в том, что равновесие достигнуто. После этого смеси переносят на фиксирующий планшет для инкубации при комнатной температуре (например, в течение 1 часа). Затем раствор удаляют, и планшет промывают восемь раз 0,1% Tween-20 в PBS. После того, как планшеты высыхают, добавляют 150 мкл/лунка сцинтиллятора (MicroScint-20; Packard), и проводят подсчет в планшетах с использованием счетчика гамма-импульсов (Packard) в течение 10 минут. Концентрации каждого из Fab, которые обеспечивают связывание, меньшее или равное 20% от максимального связывания, выбирают для использования в конкурентных анализах связывания. В соответствии с другим вариантом K_d или величину K_d измеряют с использованием анализа способом поверхностного плазмонного резонанса, в таких анализах можно использовать BIAcoreTM-2000 или BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным на них антигеном при ~10 единицах ответа (RU). В кратком изложении, биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика.

Антиген разбавляют 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/минута для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена инъецируют 1 М этаноламин для блокирования не вступивших в реакцию групп. Для определения показателей кинетики, двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% Tween 20 (PBST) при 25°C со скоростью потока приблизительно 25 мкл/мин. Константу ассоциации (k_{on}) и константу диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием простой модели связывания Ленгмюра "один к одному" (BIAcore Evaluation Software версии 3.2) посредством одновременного приведения в соответствие сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (Kd) вычисляют как соотношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol.

293:865-881. Если константа ассоциации антитела превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ в анализе способом поверхностного плазмонного резонанса, указанным выше, тогда константу ассоциации можно определять с использованием способа тушения флуоресценции, в котором измеряют повышение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C 20 нМ антитела против антигена (форма Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена при измерении в спектрофотометре, таком как спектрофотометр с останавливаемой струей (Aviv Instruments) или спектрофотометр SLM-Aminco серии 8000 (Thermo Spectronic) с перемешиваемой кюветой.

"Скорость связывания" или "скорость ассоциации" или "скорость соединения" или " k_{on} " согласно этому изобретению также можно определять с помощью указанного способа поверхностного плазмонного резонанса, описанного выше, с использованием BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), как описано выше.

Выражение "по существу сходный" или "по существу такой же", как используют в настоящем документе, обозначает достаточно высокую степень сходства между двумя числовыми значениями (как правило, одно связано с антителом по изобретению, а другое связано с эталонным/сравнительным антителом), так что специалист в данной области может считать различие между двумя значениями небольшим или не имеющим биологической и/или статистической значимости в контексте биологического признака, измеряемого указанными значениями (например, значениями Kd). Различие между указанными двумя значениями предпочтительно составляет менее чем приблизительно 50%, предпочтительно менее чем приблизительно 40%, предпочтительно менее чем приблизительно 30%, предпочтительно менее чем приблизительно 20%, предпочтительно менее чем приблизительно 10% в качестве функции от значения для эталонного/сравнительного антитела.

Выражение "значимо сниженный" или "значимо отличающийся", как используют в настоящем документе, обозначает значимую высокую степень отличия между двумя числовыми значениями (как правило, одно связано с антителом по изобретению, а другое связано с эталонным/сравнительным антителом), так что специалист в данной области может считать различие между двумя значениями статистически значимым в контексте биологического признака, измеряемого указанными значениями (например, значениями Kd, ответом НАМА). Различие между указанными двумя значениями предпочтительно составляет более чем приблизительно 10%, предпочтительно более чем приблизительно 20%, предпочтительно более чем приблизительно 30%, предпочтительно более чем приблизительно 40%, предпочтительно более чем приблизительно 50% в качестве функции от значения для эталонного/сравнительного

антитела.

"Антиген" представляет собой заданный антиген, с которым селективно связывается антитело. Антиген-мишень может представлять собой полипептид, углеводород, нуклеиновую кислоту, липид, гаптен или другое встречающееся в природе или синтетическое соединение. Предпочтительно, антиген-мишень представляет собой полипептид.

"Акцепторная каркасная область человека" для целей настоящего описания представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, образованной каркасной областью иммуноглобулина человека или консенсусной последовательностью каркасной области человека. Акцепторная каркасная область человека, "образованная" каркасной областью иммуноглобулина человека или консенсусной последовательностью каркасной области человека может содержать саму их аминокислотную последовательность, или она может содержать существовавшие ранее изменения в аминокислотных последовательностях. Там, где присутствуют существовавшие ранее аминокислотные изменения, предпочтительно, чтобы присутствовало не более 5 и, предпочтительно, 4 или менее, или 3 или менее, существовавших ранее аминокислотных изменений. Там, где присутствуют существовавшие ранее аминокислотные изменения в V_H , предпочтительно, чтобы указанные изменения существовали только в трех, двух или одном из положений 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные остатки в указанных положениях могут представлять собой 71A, 73T и/или 78A. В одном варианте осуществления, акцепторная каркасная область VL человека идентична по последовательности каркасной области VL иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области человека.

"Консенсусная последовательность каркасной области человека" представляет собой каркасную область, которая представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека. Обычно выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей переменных доменов. Обычно подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу согласно Кабат. В одном варианте осуществления, для VL, подгруппа представляет собой подгруппу каппа I по Кабат. В одном варианте осуществления, для VH, подгруппа представляет собой подгруппу III по Кабат.

"Консенсусная каркасная область VH подгруппы III" включает консенсусную последовательность, образованную аминокислотными последовательностями переменных областей тяжелой цепи подгруппы III по Кабат. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность консенсусной каркасной области VH подгруппы III включает по меньшей мере часть или все из каждой из следующих последовательностей: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(SEQ ID NO:69)-H1-WVRQAPGKGLEWV(SEQ ID NO:70)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC(SEQ ID NO:71)-H3-WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:72).

"Консенсусная каркасная область VL подгруппы I" включает консенсусную последовательность, образованную аминокислотными последовательностями переменных областей легкой цепи каппа подгруппы I по Кабат. В одном варианте осуществления, аминокислотная последовательность консенсусной каркасной области VL подгруппы I включает по меньшей мере часть или все из каждой из следующих последовательностей: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:65)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:66)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

(SEQ ID NO:67)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:68).

"Немодифицированная каркасная область человека" представляет собой каркасную область человека, которая имеет такую же аминокислотную последовательность, как и акцепторная каркасная область человека, например, она лишена замены(замен) аминокислоты человека на аминокислоту, не человека в акцепторной каркасной области человека.

"Измененная гипервариабельная область" для целей настоящего описания представляет собой гипервариабельную область, включающую одну или несколько (например от одной до приблизительно 16) аминокислотную замену(замен).

Термин "немодифицированная гипервариабельная область" для целей настоящего описания представляет собой гипервариабельную область, имеющую такую же аминокислотную последовательность, как и антитело не человека, из которого она получена, то есть гипервариабельную область, в которой отсутствует одна или несколько аминокислотных замен.

Антитело, "которое связывает" представляющий интерес антиген, например, ассоциированный с опухолью полипептидный антиген-мишень, представляет собой антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью, так что антитело является подходящим в качестве лекарственного средства для нацеливания его на клетку или ткань, экспрессирующие антиген, и которое не реагирует перекрестно с другими белками в значительной степени. В таких вариантах осуществления степень связывания антитела с белком-"не мишенью" будет составлять менее 10% от связывания антитела с его специфическим белком-мишенью, как определяют в анализе сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS) или с помощью радиоиммунной преципитации (RIA). Что касается связывания антитела с молекулой-мишенью, термины "специфическое связывание" или "специфически связывается с" или является "специфичным к" конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени, означают связывание, которое на поддающемся измерению уровне отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу со сходной структурой, которая не обладает активностью связывания. Например, специфическое связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, которая является сходной с мишенью, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае на специфическое связывание указывает то, что связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. Термины "специфическое связывание" или "специфически связывается с" или является "специфическим к" конкретному полипептиду или эпитопу на конкретной полипептиде-мишени, как используют в настоящем документе, может быть проиллюстрирован, например, молекулой, имеющей K_d для мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, альтернативно по меньшей мере приблизительно 10^{-5} М, альтернативно по меньшей мере приблизительно 10^{-6} М, альтернативно по меньшей мере приблизительно 10^{-7} М, альтернативно, по меньшей мере приблизительно 10^{-8} М, альтернативно по меньшей мере приблизительно 10^{-9} М, альтернативно по меньшей мере приблизительно 10^{-10} М, альтернативно по меньшей мере приблизительно 10^{-11} М, альтернативно по меньшей мере приблизительно 10^{-12} М, или более. В одном варианте осуществления, термин "специфическое связывание" относится к связыванию, когда молекула связывается с

конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде без связывания на существенном уровне с каким-либо другим полипептидом или эпитопом полипептида.

Антитело, которое "ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих полипептид CD79b" или "ингибирующее рост" антитело представляет собой антитело, которое приводит к поддающемуся измерению ингибированию роста злокачественных клеток, экспрессирующих или сверхэкспрессирующих соответствующий полипептид CD79b. Полипептид CD79b может представлять собой трансмембранный полипептид, экспрессированный на поверхности злокачественной клетки, или он может представлять собой полипептид, который продуцируется и секретируется злокачественной клеткой.

Предпочтительные ингибирующие рост антитела против CD79b ингибируют рост экспрессирующих CD79b опухолевых клеток более чем на 20%, предпочтительно от приблизительно 20% до приблизительно 50%, и более предпочтительно более чем на 50% (например, от приблизительно 50% до приблизительно 100%) по сравнению с соответствующим контролем, причем контролем обычно являются опухолевые клетки, которые не обработаны тестируемым антителом. В одном варианте осуществления, ингибирование роста можно измерить при концентрации антитела приблизительно от 0,1 до 30 мкг/мл или приблизительно от 0,5 нМ до 200 нМ в клеточной культуре, где ингибирование роста определяют через 1-10 суток после воздействия на опухолевые клетки антитела. Ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo* можно определять различными способами, такими как способы, описанные в разделе "Экспериментальные примеры", ниже. Антитело является ингибирующим рост *in vivo*, если введение антитела против CD79b в концентрации от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела приводит к уменьшению размера опухоли или пролиферации опухолевых клеток в течение приблизительно от 5 суток до 3 месяцев с момента первого введения антитела, предпочтительно в течение приблизительно от 5 до 30 суток.

Антитело, которое "индуцирует апоптоз" представляет собой антитело, которое индуцирует запрограммированную гибель клеток, как определяют по связыванию аннексина V, фрагментации ДНК, сморщиванию клетки, расширению эндоплазматической сети, фрагментации клетки, и/или образованию мембранных везикул (называемых апоптотическими тельцами). Обычно такой клеткой является клетка, сверхэкспрессирующая полипептид CD79b. Предпочтительно, клетка представляет собой опухолевую клетку, например, гематopoэтическую клетку, такую как В-клетка, Т-клетка, базофил, эозинофил, нейтрофил, моноцит, тромбоцит или эритроцит. Доступны различные способы оценки клеточных событий, связанных с апоптозом. Например, транслокацию фосфатидилсерина (PS) можно измерить по связыванию аннексина; фрагментацию ДНК можно оценить по лестничной ДНК; и конденсацию ядро/хроматин вместе с фрагментацией ДНК можно оценить по увеличению числа гиподиплоидных клеток. Предпочтительно, антитело, которое индуцирует апоптоз, представляет собой антитело, которое вызывает индукцию связывания аннексина приблизительно от 2 до 50 раз, предпочтительно приблизительно от 5 до 50 раз, и наиболее предпочтительно приблизительно от 10 до 50 раз превышающее связывание аннексина необработанными клетками в анализе связывания аннексина.

Антитело, которое "индуцирует гибель клеток", представляет собой антитело, которое приводит к тому, что живые клетки становятся неживыми. Клетка представляет собой клетку, экспрессирующую полипептид CD79b и является клеткой такого типа, которая специфически экспрессирует или сверхэкспрессирует полипептид CD79b. Такая клетка может быть злокачественной или нормальной клеткой конкретного клеточного типа.

Полипептид CD79b может представлять собой трансмембранный полипептид, экспрессируемый на поверхности злокачественной клетки, или может представлять собой полипептид, который продуцируется и секретируется злокачественной клеткой. Клетка может представлять собой злокачественную клетку, например, В-клетку или Т-клетку. Гибель клетки *in vitro* можно определять в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток, чтобы отличить ее от гибели клетки, индуцируемой антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC). Таким образом, анализ гибели клетки можно проводить с использованием инактивированной нагреванием сыворотки (то есть, в отсутствии комплемента) и в отсутствие иммунных эффекторных клеток. Для выяснения того, способно ли антитело индуцировать гибель клетки, можно оценивать утрату целостности мембраны, как оценивают по захвату йодида пропидия (PI), трипана синего (см. Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) или 7AAD, относительно необработанных клеток. Предпочтительными индуцирующими гибель клетки антителами являются антитела, которые индуцируют захват PI в анализе захвата PI в клетках BT474.

"Эффекторные функции" антитела относятся к таким видам биологической активности, которые являются свойственными Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или варианта Fc-участка по аминокислотной последовательности) антитела, и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и активацию В-клеток.

Термин "Fc-область" используют в настоящем документе для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-областей. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как отрезок от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до его С-конца. С-концевой лизин (остаток 447 в системе нумерации EU) Fc-области может быть удален, например, в процессе получения или очистки антитела, или при рекомбинантном конструировании нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может включать совокупности антител, во всех из которых удален остаток K447, совокупности антител, в которых не удален остаток K447, и совокупности антител, содержащие смесь антител, содержащих и не содержащих остаток K447.

"Функциональная Fc-область" обладает "эффекторной функцией" Fc-области с нативной последовательностью. Примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q; CDC; связывание Fc-рецептора; ADCC; фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела) и их можно оценить, используя различные анализы, как описано, например, в разделе "Определения" настоящего документа.

"Fc-область с нативной последовательностью" включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Fc-области человека с нативной последовательностью включают Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью (аллотипы не-A и A); Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG3

человека с нативной последовательностью; и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты.

"Вариант Fc-области" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от Fc-области с нативной последовательностью тем, что содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, предпочтительно одну или несколько аминокислотную замену(замен). Предпочтительно, вариант Fc-области включает по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или с Fc-областью исходного полипептида, например от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариант Fc-области в настоящем документе предпочтительно обладает по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-областью с нативной последовательностью и/или Fc-областью исходного полипептида, и наиболее предпочтительно он обладает гомологией с ними по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно он обладает гомологией с ними по меньшей мере приблизительно 95%.

"Антителозависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемые Ig, связанные с Fc-рецепторами (FcR), находящимися на определенных цитотоксических клетках (например, естественных киллерных (NK) клетках, нейтрофилах и макрофагах), вызывают специфичное для этих цитотоксических эффекторных клеток связывание с несущей антиген клеткой-мишенью, а затем уничтожают клетки-мишени посредством цитотоксинов. Антитела являются "оружием" цитотоксических клеток, и они абсолютно необходимы для такого уничтожения. Основные клетки для осуществления ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках представлена в таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Для оценки активности представляющей интерес молекулы в отношении ADCC, можно проводить анализ ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патенте США No. 5500362 или 5821337. Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) и естественные киллерные (NK) клетки. Альтернативно, или дополнительно, активность представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описана в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

Термины "Fc-рецептор" или "FcR" обозначают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Более того, предпочтительным FcR является FcR, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно-сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые обладают сходными аминокислотными последовательностями, отличающимися, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозин-связывающий активирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозин-связывающий ингибирующий мотив (ITIM), (см. обзор М. в Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234

(1997)). FcR описаны в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). К термину "FcR" в настоящем описании относятся другие FcR, в том числе FcR, которые будут выявлены в будущем. Термин также включает в себя неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Связывание с FcRn человека *in vivo* и период полужизни в сыворотке для полипептидов с высокой аффинностью связывания FcRn человека можно анализировать, например, у трансгенных мышей или в трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих FcRn человека, или у приматов, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области. В WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с повышенным или сниженным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

"Эффекторные клетки человека" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно, клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры лейкоцитов человека, которые осуществляют ADCC, включают периферические моноклеарные клетки крови (PBMC), естественные киллерные (NK) клетки, моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом предпочтительными являются PBMC и NK-клетки. Эффекторные клетки можно выделять из их природных источников, например, из крови.

"Комплемент-зависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического каскада комплемента начинается со связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), связанными с распознаваемым им антигеном. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или сниженной способностью связывать C1q описаны в патенте США No. 6194551B1 и WO1999/51642. См. также, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Термин "содержащее Fc-область антитело" относится к антителу, которое включает Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc-области может быть удален, например, во время очистки антитела или путем рекомбинантного конструирования антитела, кодируемого нуклеиновой кислотой. Таким образом, композиция, включающая содержащее Fc-область антитело, в соответствии с настоящим изобретением может включать антитело, содержащее K447, антитело, из которого полностью удален K447, или смесь антител, содержащих и не содержащих остаток K447.

Термин "внеклеточный домен" полипептида CD79b или "ECD" относится к форме полипептида CD79b, которая по существу не содержит трансмембранного и цитоплазмического доменов. Обычно, ECD полипептида CD79b содержит менее 1% таких трансмембранных и/или цитоплазмических доменов, и предпочтительно он содержит менее 0,5% таких доменов. Понятно, что любые трансмембранные домены, идентифицированные для полипептидов CD79b по настоящему изобретению, идентифицируют в соответствии с критериями, обычно используемыми в данной области для идентификации гидрофобного домена такого типа. Точные границы трансмембранного домена могут варьировать, но, наиболее вероятно, не более чем приблизительно на 5 аминокислот в любую сторону от домена, как исходно определено в настоящем документе. Таким образом, необязательно внеклеточный домен

полипептида CD79b может содержать приблизительно 5 или менее аминокислот с любой стороны границы между трансмембранным доменом/внеклеточным доменом, как указано в примерах или описании, и такие полипептиды, содержащие или не содержащие связанного с ними сигнального пептида, и кодирующие их нуклеиновые кислоты

5 предусматриваются настоящим изобретением.

Приблизительное положение "сигнальных пептидов" полипептида CD79b, описанного в настоящем документе, может быть показано в настоящем описании и/или на соответствующих рисунках. Однако следует отметить, что С-концевая граница сигнального пептида может варьировать, но наиболее вероятно, не более чем

10 приблизительно на 5 аминокислот в любую сторону от С-концевой границы сигнального пептида, как исходно идентифицировано в настоящем документе, где С-концевая граница сигнального пептида может быть определена в соответствии с критериями, которые обычно используют в данной области для идентификации такого типа элемента аминокислотной последовательности (см. например, Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997)

15 и von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Кроме того, известно, что в некоторых случаях отщепление сигнальной последовательности от секретируемого полипептида не является полностью одинаковым, что приводит более чем к одному виду секретируемого полипептида. Такие зрелые полипептиды, в которых сигнальный пептид отщепляется в пределах не более чем приблизительно 5 аминокислот с каждой

20 из сторон С-концевой границы сигнального пептида, как идентифицировано в настоящем документе, и кодирующие их полинуклеотиды предусматриваются настоящим изобретением.

Термин "вариант полипептида CD79b" означает полипептид CD79b, предпочтительно активный полипептид CD79b, как описано в настоящем документе, обладающий по

25 меньшей мере приблизительно 80% идентичностью аминокислотной последовательности с полноразмерным полипептидом CD79b с нативной последовательностью, как описано в настоящем документе, последовательность полипептида CD79b, в которой отсутствует сигнальный пептид, как описано в настоящем документе, внеклеточный домен полипептида CD79b с сигнальным пептидом, или без него, или любой другой фрагмент

30 полноразмерной последовательности полипептида CD79b, как описано в настоящем документе (такой, как фрагменты, которые кодируются нуклеиновой кислотой, которая представляет собой только часть полной кодирующей последовательности полноразмерного полипептида CD79b). Такие варианты полипептида CD79b включают, например, полипептиды CD79b, где добавлен или удален один или несколько

35 аминокислотных остатков на N- или С-конце полноразмерной нативной аминокислотной последовательности. Обычно вариант полипептида CD79b обладает по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью аминокислотной последовательности, альтернативно, по меньшей мере приблизительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью

40 аминокислотной последовательности с полноразмерным полипептидом CD79b с нативной последовательностью, как описано в настоящем документе, последовательностью полипептида CD79b, в которой отсутствует сигнальный пептид, как описано в настоящем документе, внеклеточным доменом полипептида CD79b с сигнальным пептидом или без него, как описано в настоящем документе, или любым

45 другим конкретно определенным фрагментом полноразмерной последовательности полипептида CD79b, как описано в настоящем документе. Обычно варианты полипептида CD79b имеют длину по меньшей мере приблизительно 10 аминокислот, альтернативно по меньшей мере приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110,

120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 аминокислот или более. Необязательно, варианты полипептидов CD79b содержат не более одной консервативной

5 аминокислотной замены по сравнению с полипептидом CD79b с нативной последовательностью, альтернативно не более 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 консервативных аминокислотных замен по сравнению с полипептидом CD79b с нативной последовательностью.

"Процентную (%) идентичность аминокислотных последовательностей" в отношении

10 последовательности пептида или полипептида, т.е. последовательностей полипептидов CD79b, идентифицированных в настоящем документе, определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной последовательности пептида или полипептида, т.е. последовательности полипептида CD79b, после выравнивания последовательностей

15 и внесения пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, и не считая какие-либо консервативные замены частью идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей можно проводить различными способами, которые известны в данной области, например, с

20 использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для проведения выравнивания, включая любые алгоритмы, требуемые для достижения максимального выравнивания на протяжении всей длины сравниваемых

25 последовательностей. Однако для целей, представленных в настоящем документе, значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2, где полный исходный текст для программы ALIGN-2 предоставлен в таблице 1, ниже. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была составлена

30 в Genentech, Inc. и исходный текст, представленный в таблице 1, ниже, был представлен с пользовательской документацией в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной через Genentech, Inc., South San Francisco, California или ее можно составить из исходного текста, представленного в таблице 1, ниже. Программа ALIGN-2

35 должна быть составлена для применения на операционной системе UNIX, предпочтительно цифровой UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей установлены программой ALIGN-2 и не изменяются.

В случаях, когда ALIGN-2 используют для сравнений аминокислотных последовательностей, % идентичность аминокислотных последовательностей для

40 данной аминокислотной последовательности A к, с или против данной аминокислотной последовательности B (что альтернативно может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность A, которая обладает определенной % идентичностью аминокислотной последовательности или содержит % идентичность аминокислотной последовательности, к, с или против данной аминокислотной

45 последовательности B), или вычисляют следующим образом:

$100 \times \frac{\text{число совпадений}}{\text{длина выравнивания}}$

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2 при

выравнивании этой программой А и В, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Понятно, что когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичность аминокислотных последовательностей А к В не равна % идентичности аминокислотных последовательностей В к А.

"Вариант полинуклеотида CD79b" или "вариант последовательности нуклеиновой кислоты CD79b" означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид CD79b, предпочтительно активный полипептид CD79b, как определено в настоящем документе, и которая обладает по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерную последовательность полипептида CD79b с нативной последовательностью, идентифицированного в настоящем документе, полноразмерную последовательность полипептида CD79b с нативной последовательностью, в которой отсутствует сигнальный пептид, как описано в настоящем документе, внеклеточный домен полипептида CD79b с сигнальным пептидом, или без него, как описано в настоящем документе, или любой другой фрагмент полноразмерной последовательности полипептида CD79b, как описано в настоящем документе (такой, как фрагменты, которые кодируются нуклеиновой кислотой, которая представляет собой только часть полной кодирующей последовательности полноразмерного полипептида CD79b). Как правило, такие варианты полинуклеотидов CD79b обладают по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты, альтернативно по меньшей мере приблизительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерную последовательность полипептида CD79b с нативной последовательностью, как описано в настоящем документе, полноразмерную последовательность полипептида CD79b с нативной последовательностью, в которой отсутствует сигнальный пептид, как описано в настоящем документе, внеклеточный домен полипептида CD79b с сигнальным пептидом, или без него, как описано в настоящем документе, или любой другой фрагмент полноразмерной последовательности полипептида CD79b, как описано в настоящем документе. Варианты не включают нативную нуклеотидную последовательность.

Как правило, длина вариантов полинуклеотидов CD79b составляет по меньшей мере 5 нуклеотидов, альтернативно она составляет по меньшей мере приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 или 1000 нуклеотидов, где в этом контексте термин "приблизительно" означает указанную длину нуклеотидной последовательности плюс или минус 10% от этой указанной длины.

"Процентную идентичность (%) последовательностей нуклеиновых кислот" в отношении последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CD79b, идентифицированных в настоящем документе, определяют как процент нуклеотидов в последовательности-кандидате, которые идентичны нуклеотидам в представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты CD79b, после выравнивания

последовательностей и внесения пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности последовательностей нуклеиновых кислот можно проводить различными способами, которые находятся в пределах специальных знаний, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Однако для целей, представленных в настоящем документе, значения % идентичности последовательностей нуклеиновых кислот получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2, где полный исходный текст для программы ALIGN-2 предоставлен в таблице 1, ниже. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была составлена в Genentech, Inc. и исходный текст, представленный в таблице 1, ниже, был представлен с пользовательской документацией в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной через Genentech, Inc., South San Francisco, California или ее можно составить из исходного текста, представленного в таблице 1, ниже. Программа ALIGN-2 должна быть составлена для применения на операционной системе UNIX, предпочтительно цифровой UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей установлены программой ALIGN-2 и не изменяются.

В случаях, когда ALIGN-2 используют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, % идентичность последовательностей нуклеиновых кислот для данной последовательности нуклеиновой кислоты C к, с, или против данной последовательности нуклеиновой кислоты D (которая альтернативно может быть сформулирована как данная последовательность нуклеиновой кислоты C, которая имеет или включает определенную % идентичность последовательности нуклеиновой кислоты к, с, или против данной последовательности нуклеиновой кислоты D) вычисляют следующим образом:

$100, \text{ умноженное на частное } W/Z$

где W представляет собой количество нуклеотидов, оцененных как идентичные совпадения программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2 при выравнивании этой программой C и D, и где Z представляет собой общее число нуклеотидов в D. Понятно, что когда длина последовательности нуклеиновой кислоты C не равна длине последовательности нуклеиновой кислоты D, % идентичность последовательности нуклеиновой кислоты C относительно D не будет равна % идентичности последовательности нуклеиновой кислоты D относительно C. Если конкретно не указано иное, все значения % идентичности последовательностей нуклеиновых кислот, используемые в настоящем документе, получены, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

В других вариантах осуществления варианты полинуклеотидов CD79b представляют собой молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептид CD79b и которые способны гибридизоваться предпочтительно в жестких условиях гибридизации и промывания с нуклеотидными последовательностями, кодирующими полноразмерный полипептид CD79b, как описано в настоящем документе. Варианты полипептидов CD79b могут представлять собой полипептиды, которые кодируются вариантами полинуклеотидов CD79b.

Термин "полноразмерная кодирующая область", когда его используют в отношении нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CD79b, относится к последовательности нуклеотидов, которая кодирует полноразмерный полипептид CD79b по настоящему

изобретению (который часто изображен иницирующим кодоном и стоп-кодоном, включительно, на прилагаемых рисунках). Термин "полноразмерная кодирующая область", когда его используют в отношении нуклеиновой кислоты, депонированной в АТСС, относится к кодирующей полипептид CD79b части кДНК, которая встроена в вектор, депонированный в АТСС (который часто изображен начальным кодоном и стоп-кодоном, включительно, на прилагаемых рисунках (иницирующий кодон и стоп-кодон обозначены полужирным шрифтом и подчеркнуты на рисунках)).

"Выделенный", при применении для описания различных полипептидов CD79b, описанных в настоящем документе, означает полипептид, который идентифицирован и отделен и/или выделен из компонента его природного окружения. Загрязняющие компоненты его природного окружения представляют собой материалы, которые, как правило, препятствуют диагностическому и терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления такие полипептиды будут очищать (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (2) до гомогенности при SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси синего или, предпочтительно, окрашивания серебром. Такие выделенные полипептиды включают соответствующие полипептиды в рекомбинантных клетках *in situ*, поскольку в этом случае будет отсутствовать по меньшей мере один компонент природного окружения полипептида CD79b. Однако, как правило, такие полипептиды можно получать посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

"Выделенная" нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CD79b, или нуклеиновая кислота, кодирующая другой полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в природном источнике кодирующей полипептид нуклеиновой кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид находится в другой форме или условиях, чем форма и условия, в которых она встречается в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, отличаются от конкретной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, которая существует в природных клетках. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, включает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, содержащиеся в клетках, которые обычно экспрессируют полипептид, где, например, молекула нуклеиновой кислоты находится в положении на хромосоме, отличном от положения на хромосоме в природных клетках.

Термин "последовательности контроля" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Последовательности контроля, которые пригодны для прокариот, включают, например, промотор, необязательно последовательность оператора и участок связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для препоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в качестве

пребелка, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосом является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен

5 таким образом, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, и, в случае секреторной лидерной последовательности, являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляют посредством лигирования в соответствующих участках рестрикции. Если таких участков

10 нет, используют синтетические олигонуклеотидные соединительные элементы или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

"Жесткость" реакций гибридизации легко определяет специалист в данной области, и, как правило, она представляет собой эмпирическое вычисление, зависящее от длины зонда, температуры промывания и концентрации соли. Как правило, для надлежащего

15 отжига более длинные зонды требуют более высоких температур, в то время как более короткие зонды требуют более низких температур. Гибридизация, как правило, зависит от способности денатурированной ДНК к повторному отжигу, когда комплементарные цепи присутствуют в окружающей среде при температуре, ниже их температуры отжига. Чем более высокой является степень требуемой гомологии между зондом и

20 гибридизуемой последовательностью, тем более высокой является относительная температура, которую можно использовать. В результате, из этого следует, что более высокие относительные температуры будут обеспечивать тенденцию к более жестким условиям реакции, в то время как более низкие температуры снижают жесткость. Для дополнительных деталей и разъяснения жесткости реакций гибридизации, см. Ausubel

25 et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Жесткие условия" или "условия высокой жесткости", как определено в настоящем документе, можно определить как условия, при которых: (1) используют низкую ионную силу и высокую температуру промывания, например 0,015 М хлорид натрия/0,0015 М

30 цитрат натрия/0,1% додецилсульфат натрия при 50°C; (2) используют в ходе гибридизации денатурирующее средство, такое как формамид, например, 50% (об./об.) формамид с 0,1% бычьим сывороточным альбумином/0,1% Ficoll/0,1% поливинилпирролидоном/50 мМ натрий-фосфатным буфером при pH 6,5 с 750 мМ хлоридом натрия, 75 мМ цитратом натрия при 42°C; или (3) проводят гибридизацию в течение ночи в растворе, в котором используется 50% формамид, 5 x SSC (0,75 М NaCl,

35 0,075 М цитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (pH 6,8), 0,1% пирогенфосфат натрия, 5 x раствор Денхардта, облученная ультразвуковым облучением ДНК спермы лосося (50 мкг/мл), 0,1% SDS и 10% сульфат декстрана при 42°C, с промыванием в течение 10 минут при 42°C в 0,2 x SSC (хлорид натрия/цитрат натрия) с последующим промыванием высокой жесткости в течение 10 минут, состоящим из 0,1 x SSC, содержащего EDTA,

40 при 55°C.

"Условия умеренной жесткости" можно определить, как описано в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, и они включают применение менее жесткого раствора для промывания и условий гибридизации (например, температуры, ионной силы и %SDS), чем раствор для промывания и условия

45 гибридизации, описанные выше. Примером умеренно жестких условий является инкубация в течение ночи при 37°C в растворе, содержащем: 20% формамид, 5 x SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ трицитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (pH 7,6), 5 x раствор Денхардта, 10% сульфат декстрана и 20 мг/мл денатурированной расщепленной ДНК

спермы лосося, с последующим промыванием фильтров в 1 x SSC при приблизительно 37-50°C. Специалисту будет понятно, каким образом корректировать температуру, ионную силу и т.д., в случае необходимости приспособления к таким факторам, как длина зонда и т.п.

Термин "меченный эпитопом", при применении в настоящем документе, относится к химерному полипептиду, содержащему полипептид CD79b, или антитело против CD79b, слитые с "полипептидом-меткой". Полипептид-метка имеет достаточное количество остатков для обеспечения эпитопа, против которого можно получать антитело, но в то же время является достаточно коротким, чтобы не препятствовать активности полипептида, с которым он слит. Также полипептид-метка предпочтительно является совершенно уникальным, так что антитело по существу не вступает в перекрестные реакции с другими эпитопами. Подходящие полипептиды-метки, как правило, имеют по меньшей мере шесть аминокислотных остатков и, как правило, между приблизительно 8 и 50 аминокислотных остатков (предпочтительно, между приблизительно 10 и 20 аминокислотных остатков).

"Активный" или "активность" для целей, представленных в настоящем документе, относится к форме(ам) полипептида CD79b, которая сохраняет биологическую и/или иммунологическую активность нативного или встречающегося в природе CD79b, где "биологическая" активность относится к биологической функции (либо ингибиторной, либо стимулирующей), обеспечиваемой нативным или встречающимся в природе CD79b, отличной от способности индуцировать образование антитела против антигенного эпитопа, которым обладает нативный или встречающийся в природе CD79b, и "иммунологическая" активность относится к способности индуцировать образование антитела против антигенного эпитопа, которым обладает нативный или встречающийся в природе CD79b.

Термин "антагонист" используют в наиболее широком смысле, и он включает любую молекулу, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность нативного полипептида CD79b. Аналогично, термин "агонист" используют в наиболее широком смысле, и он включает любую молекулу, которая имитирует биологическую активность нативного полипептида CD79b.

Подходящие молекулы агонистов и антагонистов конкретно включают антитела-антагонисты или антитела-агонисты, или фрагменты этих антител, фрагменты или варианты по аминокислотной последовательности нативных полипептидов CD79b, пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды, низкомолекулярные органические молекулы и т.д. Способы идентификации антагонистов или агонистов полипептида CD79b могут включать контактирование полипептида CD79b с молекулой-кандидатом агониста или антагониста и измерение поддающегося детекции изменения одного или нескольких видов биологической активности, обычно ассоциированных с полипептидом CD79b.

"Очищенный" означает, что молекула присутствует в образце в концентрации по меньшей мере 95% по массе, или по меньшей мере 98% по массе образца, в котором она содержится.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена по меньшей мере от одной другой молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована, например, в ее природном окружении. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кроме того, включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно экспрессируют молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты находится вне хромосомы или в области хромосомы, которая отличается от ее природного

расположения на хромосоме.

Термин "вектор", как используют в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной осуществлять транспорт другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Одним типом вектора является "плаزمид", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является фаговый вектор. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный ориджин репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут встраиваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, тем самым, они реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют в настоящем документе "рекомбинантными экспрессирующими векторами" (или просто, "рекомбинантными векторами"). Как правило, экспрессирующие векторы, применяемые в способах рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании, термины "плазмид" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазмид является наиболее часто используемой формой вектора.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относится к полимерам нуклеотидов любой длины, и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразой, или посредством синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. До и после сборки полимера может происходить модификация нуклеотидной структуры, если она происходит. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Кроме того, полинуклеотид может быть модифицирован после полимеризации, например, конъюгацией с осуществляющим мечение компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замену одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, например, такие как модификации незаряженными связями (например, метилфосфонатами, фосфотриэфирами, фосфоамидами, карбаматами и т.д.) и заряженными связями (например, фосфоротиоатами, фосфородитиоатами, и т.д.), модификации выступающими группами, например, такими как белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), модификации интеркаляторами (например, акридином, псораленом, и т.д.), модификации хелаторами (например, металлами, радиоактивными металлами, бором, окислительными металлами и т.д.), модификации алкилирующими соединениями, модификации модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любые гидроксильные группы, обычно присутствующие в сахарах, могут быть заменены, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, они могут быть защищены стандартными защитными группами или активированы для образования дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или они могут быть конъюгированы с твердыми или полу-твердыми подложками. 5'- и 3'-концевой ОН может быть фосфорилирован или замещен аминами или органическими кэпирующими

группами из от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые, главным образом, известны в данной области, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, карбоциклические аналоги сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, сахара пиранозы, сахара фуранозы, седогептулозы, ациклические аналоги и абазические нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными линкерными группами. Эти альтернативные линкерные группы включают, но не ограничиваются ими, варианты осуществления, где фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), где каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную связь (-O-), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не обязательно, чтобы все связи в полинуклеотиде были идентичными. Представленное выше описание применимо ко всем полинуклеотидам, указанным в настоящем документе, включая РНК и ДНК.

"Олигонуклеотид", как используют в настоящем документе, относится, главным образом, к коротким, как правило, одноцепочечным, как правило, синтетическим полинуклеотидам длиной, как правило, но не обязательно, менее 200 нуклеотидов. Термины "олигонуклеотид" и "полинуклеотид" не являются взаимоисключающими. Представленное выше описание полинуклеотидов в равной степени и полностью применимо к олигонуклеотидам.

Термины "злокачественная опухоль" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры злокачественной опухоли включают, но не ограничиваются ими, гемопозитические злокачественные опухоли или связанные с кровью злокачественные опухоли, такие как лимфома, лейкоз, миелома или лимфоидные злокачественные опухоли, а также злокачественные опухоли селезенки и злокачественные опухоли лимфатических узлов, а также карциному, бластому и саркому. Более конкретные примеры злокачественной опухоли включают ассоциированные с В-клетками злокачественные опухоли, включая например, высокодифференцированные, промежуточные и низкодифференцированные лимфомы (включая В-клеточные лимфомы, например, такие как В-клеточная лимфома ассоциированной со слизистой оболочкой лимфоидной ткани и неходжжеская лимфома (NHL), лимфома из клеток мантийной зоны, лимфома Беркитта, мелколимфоцитарная лимфома, лимфома маргинальной зоны, диффузная крупноклеточная лимфома, фолликулярная лимфома и лимфома Ходжкина, и Т-клеточные лимфомы) и лейкозы (включая вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), такой как В-клеточный лейкоз (CD5+ В-лимфоциты), миелоидный лейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоидный лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ALL) и миелодисплазия), и другие гематологические и/или ассоциированные с В-клетками или Т-клетками злокачественные опухоли. Также включаются злокачественные опухоли вспомогательных кроветворных клеток, включая полиморфноядерные лейкоциты, такие как базофилы, эозинофилы, нейтрофилы и моноциты, дендритные клетки, тромбоциты, эритроциты и естественные киллерные клетки. Также включаются злокачественные В-клеточно-пролиферативные нарушения, выбранные из следующих:

лимфома, неходжкинская лимфома (NHL), агрессивная NHL, рецидивирующая агрессивная NHL, рецидивирующая вялотекущая NHL, рефрактерная NHL, рефрактерная вялотекущая NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфома из клеток мантийной зоны. Источники В-клеточных злокачественных опухолей включают следующие: В-клеточная лимфома маргинальной зоны происходит из В-клеток памяти в маргинальной зоне, фолликулярная лимфома и диффузная крупноклеточная В-лимфома происходят из centroцитов в светлой зоне герминативных центров, хронический лимфоцитарный лейкоз и мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз происходят из В1-клеток (CD5+), лимфома из клеток мантийной зоны происходит из наивных В-клеток в мантийной зоне, и лимфома Беркитта происходит из центробластов в темной зоне герминативных центров. Ткани, которые включают кроветворные клетки, называемые в настоящем документе "тканями гемопоэтических клеток", включают тимус и костный мозг и периферические лимфоидные ткани, такие как селезенка, лимфатические узлы, лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистой оболочкой, такие как ассоциированные с кишечником лимфоидные ткани, миндалевидные железы, пейеровы бляшки и аппендикс и лимфоидные ткани, ассоциированные с другими слизистыми оболочками, например, с выстилкой бронхов. Другие конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, злокачественную опухоль брюшины, печеночноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак ободочной и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, карциному печени, лейкоз и другие лимфопролиферативные нарушения, и различные типы рака головы и шеи.

"В-клеточная злокачественная опухоль" в настоящем документе включает неходжкинскую лимфому (NHL), в том числе низкодифференцированную/фолликулярную NHL, мелколимфоцитарную NHL (SL), промежуточно-дифференцированную/фолликулярную NHL, промежуточно-дифференцированную диффузную NHL, высокодифференцированную иммунобластную NHL, высокодифференцированную лимфобластную NHL, высокодифференцированную мелкоклеточную NHL с нерасщепленными ядрами, NHL с массивным поражением, лимфому из клеток мантийной зоны, ассоциированную со СПИД лимфому, и макроглобулинемию Вальденстрема; неходжкинскую лимфому (NHL), болезнь Ходжкина с преобладанием лимфоцитов (LPHD), мелколимфоцитарную лимфому (SLL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), вялотекущую NHL, включая рецидивирующую вялотекущую NHL и рефрактерную к ритуксимабу вялотекущую NHL; лейкоз, в том числе острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз; лимфому клеток мантийной зоны; и другие гематологические злокачественные опухоли. Такие злокачественные опухоли можно лечить антителами, направленными против маркеров В-клеточной поверхности, таких как CD79b. В настоящем документе предусматриваются, что такие заболевания можно лечить путем введения антитела, направленного против маркера В-клеточной поверхности, такого как CD79b, и оно включает введение неконъюгированного ("голого") антитела или антитела,

конъюгированного с цитотоксическим средством, как описано в настоящем документе. Также в настоящем документе предусматривается, что такие заболевания можно лечить комбинированной терапией, включающей антитело против CD79b или конъюгат антитела против CD79b с лекарственным средством по изобретению в сочетании с другим антителом или конъюгатом антитела и лекарственного средства, другим цитотоксическим средством, лучевой терапией или другим способом лечения, проводимым одновременно или последовательно. В иллюстративном способе лечения по изобретению, антитело против CD79b по изобретению вводят в сочетании с антителом против CD20, иммуноглобулином, или его связывающим CD20 фрагментом, либо вместе, либо последовательно. Антитело против CD20 может представлять собой "голое" антитело или конъюгат антитела и лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления комбинированной терапии, антитело против CD79b представляет собой антитело по настоящему изобретению, а антитело против CD20 представляет собой Rituxan® (ритуксимаб).

Как используют в рамках настоящей заявки, термин "неходжская лимфома" или "NHL" относится к злокачественной опухоли лимфатической системы, отличной от лимфом Ходжкина. Лимфомы Ходжкина можно отличить от неходжских лимфом, главным образом, по наличию клеток Рид-Штернберга при лимфомах Ходжкина и отсутствию указанных клеток при неходжских лимфомах. Примеры неходжских лимфом, которые охватывает используемый в настоящей заявке термин, включают в себя любые лимфомы, которые специалист в данной области (например, онколог или патолог) может определить как неходжскую лимфому в соответствии с системами классификации, известными в данной области, такими как Пересмотренная европейско-американская классификация лимфом (REAL), как описано в Color Atlas of Clinical Hematology, (Third Edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Limited 2000). См., в частности фиг. 11.57, 11.58 и 11.59. Более конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, рецидивирующую или рефрактерную NHL, пограничную низкодифференцированную NHL, NHL стадии III/IV, устойчивую к химиотерапии NHL, лимфобластный лейкоз и/или лимфому предшественников В-клеток, мелколимфоцитарную лимфому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз и/или пролимфоцитарный лейкоз и/или мелколимфоцитарную лимфому, В-клеточную пролимфоцитарную лимфому, иммуноцитому и/или лимфоплазматическую лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, лимфому маргинальной зоны селезенки, экстранодальную MALT-лимфому маргинальной зоны, волосатоклеточный лейкоз, плазмацитому и/или плазмаклеточную миелому, низкодифференцированную/фолликулярную лимфому, промежуточно-дифференцированную/фолликулярную NHL, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому центрального фолликула (фолликулярную), промежуточно-дифференцированную диффузную NHL, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, NHL с агрессивным течением (в том числе пограничную NHL с агрессивным течением и рецидивирующую NHL с агрессивным течением), NHL, рецидивировавшую после аутологичной трансплантации стволовых клеток или устойчивую к ней, первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную эффузионную лимфому, высокодифференцированную иммунобластную NHL, высокодифференцированную лимфобластную NHL, высокодифференцированную мелкоклеточную NHL с нерасщепленными ядрами, NHL с массивным поражением, лимфому Беркитта, лимфобластный лейкоз и/или лимфому крупных гранулярных предшественников Т-клеток (периферических), фунгоидный микоз и/или синдром Сезари, лимфомы кожных покровов (кожные), анапластическую

крупноклеточную лимфому, ангиоцентричную лимфому.

"Нарушение" представляет собой любое состояние, при котором может быть полезным лечение веществом/молекулой или способом по изобретению. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая патологические состояния,

5 которые предрасполагают млекопитающего к рассматриваемому нарушению. Неограничивающие примеры нарушений, подлежащих лечению согласно настоящему описанию, включают злокачественные состояния, такие как злокачественные и доброкачественные опухоли; не лейкозы и лимфоидные злокачественные опухоли; нейрональные, глиальные, астроглиальные, гипоталамические нарушения и нарушения
10 других желез, макрофагальные, эпителиальные, стромальные и бластоцельные нарушения; и воспалительные, иммунологические и другие связанные с ангиогенезом нарушения. Кроме того, нарушения включают состояния, такие как В-клеточно-пролиферативные нарушения и/или В-клеточные опухоли, например, лимфому, неходжкинскую лимфому (NHL), агрессивную NHL, рецидивирующую агрессивную
15 NHL, рецидивирующую вялотекущую NHL, рефрактерную NHL, рефрактерную вялотекущую NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарную лимфому, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфому из клеток мантийной зоны.

Термины "клеточно-пролиферативное нарушение" и "пролиферативное нарушение"
20 относятся к нарушениям, которые ассоциированы с аномальной, в некоторой степени, клеточной пролиферацией. В одном варианте осуществления, клеточно-пролиферативное нарушение представляет собой злокачественную опухоль.

"Опухоль", как используют в настоящем документе, относится к любому неопластическому клеточному росту и пролиферации, как злокачественным, так и
25 доброкачественным, и к любым предзлокачественным и злокачественным клеткам и тканям.

"Аутоиммунное заболевание" в настоящем документе представляет собой заболевание или нарушение, возникающее в собственных тканях индивидуума и направленное против них, или отдельный его признак или его проявление, или состояние, возникающее
30 как его следствие. При многих из этих аутоиммунных и воспалительных нарушений, может существовать ряд клинических и лабораторных маркеров, включая, но не ограничиваясь ими, гипергаммаглобулинемию, высокие уровни аутоантител, отложения комплексов антиген-антитело в тканях, польза от лечения кортикостероидами или иммунодепрессивными средствами, и агрегаты лимфоидных клеток в пораженных
35 тканях. Не ограничиваясь какой-либо теорией, касающейся опосредуемого В-клетками аутоиммунного заболевания, полагают, что В-клетки демонстрируют патогенный эффект при аутоиммунных заболеваниях человека через множество механических каскадов, включая продукцию аутоантител, образование иммунных комплексов, активацию дендритных клеток и Т-клеток, синтез цитокинов, прямое высвобождение
40 хемокинов, и обеспечение очага для эктопического нелимфогенеза. Каждый из этих каскадов может участвовать в патологии аутоиммунных заболеваний в различной степени.

"Аутоиммунное заболевание" может быть органоспецифическим заболеванием (т.е., иммунный ответ специфично направлен против системы органов, такой как эндокринная
45 система, гемопоэтическая система, кожа, сердечно-легочная система, желудочно-кишечная и печеночная системы, почечная система, щитовидная железа, уши, нервно-мышечная система, центральная нервная система и т.д.) или системным заболеванием, которое может поражать множество систем органов (например, системная красная

волчанка (SLE), ревматоидный артрит, полимиозит, и т.д.). Предпочтительно, такие заболевания включают аутоиммунные ревматологические нарушения (например, такие как ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермия, волчанка, такая как SLE и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, синдром антифосфолипидных антител, и псориатический артрит), аутоиммунные желудочно-кишечные нарушения и нарушения печени (например, такие как воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозную анемию, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, и глютеную энтеропатию), васкулит (например, такой как ANCA-отрицательный васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Черджа-Строса, гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит), аутоиммунные неврологические нарушения (например, такие как рассеянный склероз, опсоклонус-миоклонус синдром, миастения, оптический миелоневрит, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полиневропатии), почечные нарушения (например, такие как гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические нарушения (например, такие как псориаз, крапивница, уртикария, пемфигус обыкновенный, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (например, такие как тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные болезни слуха (например, такие как болезнь внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, трансплантацию органов и аутоиммунные эндокринные нарушения (например, такие как связанные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулин-зависимый сахарный диабет (IDDM), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грэйвса и тиреоидит)). Более предпочтительные такие заболевания включают, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанку, рассеянный склероз, синдром Шегрена, болезнь Грэйвса, IDDM, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

Конкретные примеры других аутоиммунных заболеваний, как определено в настоящем документе, которые в некоторых случаях охватывают заболевания, приведенные выше, включают, но не ограничиваются ими, артрит (острый и хронический, ревматоидный артрит, включая ревматоидный артрит с ювенильным началом и стадии артрита, такие как ревматоидный синовит, артрит при подагре или подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, индуцированный коллагеном типа II артрит, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, артрит позвоночника, остеоартрит, хронический прогredientный артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит, связанный с менопаузой артрит, связанный с истощением эстрогенов артрит и анкилозирующий спондилит/ревматоидный спондилит), аутоиммунное лимфопролиферативное заболевание, воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как бляшковый псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз, и псориаз ногтей, атопию, включая атопические заболевания, такие как сенная лихорадка и синдром Джоба, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, эксфолиативный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, уртикарию, герпетиформный дерматит, монетовидный дерматит, себорейный дерматит, неспецифический дерматит, первичный

раздражающий контактный дерматит и атопический дерматит, х-сцепленный гипер-IgM синдром, аллергические внутриглазные воспалительные заболевания, крапивницу, такую как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, полимиозит/

5 дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, склеродермию (в том числе системную склеродермию), склероз, такой как системная склеродермия, рассеянный склероз (MS), такой как спино-оптический MS, первично-прогрессирующий MS (PPMS) и ремитирующий MS (RRMS), прогрессирующая системная склеродермия, атеросклероз, артериосклероз, множественный склероз и атаксический

10 склероз, оптический миелиневрит (NMO), воспалительное заболевание кишечника (IBD) (например, болезнь Крона, опосредуемые иммунной системой заболевания желудочно-кишечного тракта, воспаление желудочно-кишечного тракта, колит, такой как язвенный колит, *colitis ulcerosa*, микроскопический колит, коллагенозный колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, и аутоиммунное

15 воспалительное заболевание кишечника), воспаление кишечника, гангренозную пиодермию, узловатую эритему, первичный склерозирующий холангит, респираторный дистресс-синдром, в том числе респираторный дистресс-синдром у взрослых или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), менингит, воспаление всей или части сосудистой оболочки глаза, воспаление радужной оболочки глаза, хориоидит,

20 аутоиммунное гематологическое нарушение, реакцию "трансплантат против хозяина", ангионевротический отек, такой как наследственный ангионевротический отек, повреждение черепно-мозговых нервов, например, при менингите, герпес беременных, пемфигоид беременных, зуд мошонки, аутоиммунное преждевременное нарушение овуляции, внезапную потерю слуха вследствие аутоиммунного состояния, опосредуемые

25 IgE заболевания, такие как анафилаксия и аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и лимбический энцефалит или энцефалит ствола головного мозга, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный аутоиммунный увеит, гломерулонефрит (GN) с нефротическим синдромом и без него, такой как острый или хронический

30 гломерулонефрит, такой как первичный GN, опосредуемый иммунной системой GN, мембранозный GN (мембранозная нефропатия), идиопатический мембранозный GN или идиопатическая мембранозная нефропатия, мембранный или мембранозно-пролиферативный GN (MPGN), в том числе тип I и тип II, и быстро прогрессирующий GN, пролиферативный нефрит, аутоиммунную множественную недостаточность

35 эндокринных желез, баланит, включая ограниченный плазмноклеточный баланит, баланопостит, кольцевидную эритему, стойкую дисхромическую эритему, полиморфную эритему, кольцевую гранулему, блестящий лишай, склеротический и атрофический лишай, простой хронический лишай, шиловидный лишай, плоский лишай, ламеллярный ихтиоз, эпидермолитический гиперкератоз, предзлокачественный кератоз, гангренозную

40 пиодермию, аллергические состояния и ответы, пищевую аллергию, аллергию на лекарственные средства, аллергию на насекомых, редкие аллергические нарушения, такие как мастоцитоз, аллергическую реакцию, экзему, включая аллергическую или атопическую экзему, астеатозную экзему, дисгидратическую экзему и везикулярную ладонно-подошвенную экзему, астму, такую как *asthma bronchiale*, бронхиальная астма

45 и аутоиммунная астма, состояния, в которые вовлечена инфильтрация Т-клеток и хронический воспалительный ответ, иммунные реакции против чужеродных антигенов, таких как фетальные группы крови А-В-О в процессе беременности, хроническое воспалительное заболевание легких, аутоиммунный миокардит, нарушение адгезии

лейкоцитов, волчанку, включая волчаночный нефрит, волчаночный церебрит, детскую волчанку, непочечную волчанку, внепочечную волчанку, дискоидную волчанку или дискоидную красную волчанку, волчанку с алопецией, SLE, такую как кожная SLE или подострая кожная SLE, неонатальный волчаночный синдром (NLE), диссеминированную красную волчанку, волчанку, ювенильный сахарный диабет (I типа), в том числе детский IDDM, взрослый сахарный диабет (II типа), аутоиммунный диабет, идиопатический несахарный диабет, диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетический колит, диабетическое нарушение крупных артерий, иммунный ответ, ассоциированный с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, в том числе лимфоматоидный гранулематоз, агранулоцитоз, васкулит (включая васкулит крупных сосудов, такой как ревматическая полимиалгия и гигантоклеточный артериит (Такаясу), васкулит сосудов среднего калибра, такой как болезнь Кавасаки и узелковый периартериит, иммуноваскулит, васкулит в ЦНС, кожный васкулит, васкулит при гиперчувствительности, некротизирующий васкулит, такой как фибриноидный некротизирующий васкулит и системный некротизирующий васкулит, и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как синдром Черджа-Стросс (CSS), гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит), височный артериит, апластическую анемию, аутоиммунную апластическую анемию, Кумбс-положительную анемию, анемию Дамонда-Блэкфана, гемолитическую анемию или иммунную гемолитическую анемию, в том числе аутоиммунную гемолитическую анемию (AIHA), пернициозную анемию (*anemia perniciosa*), болезнь Аддисона, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (PRCA), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную нейтропению, цитопении, такие как панцитопения, лейкопения, заболевания, в которые вовлечен диapedез лейкоцитов, воспалительные нарушения в ЦНС, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром множественного поражения органов, такой как вторичные синдромы при септицемии, травме или геморрагии, заболевания, опосредуемые комплексами антиген-антитело, заболевание, связанное с антителами против клубочковой базальной мембраны, антифосфолипидный синдром, неврит двигательных нейронов, аллергический неврит, болезнь/синдром Бехчета, синдром Кастельмана, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид или пемфигус, такой как буллезный пемфигоид, рубцовый пемфигоид (пемфигоид слизистых оболочек), кожный пемфигоид, обыкновенный пемфигус, паранеопластический пемфигус, листовидный пемфигус, пемфигус слизистой оболочки и эритематозный пемфигус, приобретенный буллезный эпидермолиз, воспаление глаза, предпочтительно аллергическое воспаление глаза, такое как аллергический конъюнктивит, буллезное заболевание, связанное с линейными IgA, аутоиммунное воспаление конъюнктивы, аутоиммунные полиэндокринопатии, болезнь или синдром Рейтера, термическое повреждение вследствие аутоиммунного состояния, преэклампсия, иммунокомплексное нарушение, такое как иммунокомплексный нефрит, опосредуемый антителами нефрит, нейровоспалительные нарушения, полиневропатии, хроническую невропатию, такую как IgM-полиневропатии или опосредуемая IgM невропатия, тромбоцитопению (например, такая как развивается у пациентов с инфарктом миокарда), в том числе тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), посттрансфузионную пурпуру (РТП), индуцированную гепарином тромбоцитопению и аутоиммунную или иммунноопосредуемую или тромбоцитопению, например, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), в том числе хроническую или острую ИТП, склерит, такой как идиопатический кератосклерит, эписклерит,

аутоиммунное заболевание яичек и яичников, в том числе аутоиммунный орхит и
 оофорит, первичный гипотиреоз, гипопаратиреоз, аутоиммунные эндокринные
 заболевания, в том числе тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, болезнь
 Хашимото, или подострый тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит,
 5 аутоиммунное заболевание щитовидной железы, идиопатический гипотиреоз, болезнь
 Грэйвса, глазная болезнь Грэйвса (офтальмопатия или ассоциированная с щитовидной
 железой офтальмопатия), полигландулярные синдромы, такие как аутоиммунные
 полигландулярные синдромы, например, типа I (или полигландулярные
 эндокринопатические синдромы), паранеопластические синдромы, в том числе
 10 неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром
 Ламберта-Итона или синдром Итона-Ламберта, синдром мышечной скованности или
 "негнувшегося индивида", энцефаломиелит, такой как аллергический энцефаломиелит
 и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЕАЕ), миастению, такую как
 ассоциированная с тимомой миастения, церебеллярную дегенерацию, нейромиотонию,
 15 опсоклонус или опсоклонус-миоклонус синдром (OMS), и сенсорную невропатию,
 многоочаговую моторную невропатию, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит,
 хронический гепатит, волчаночный гепатит, гигантоклеточный гепатит, хронический
 активный гепатит или аутоиммунный хронический активный гепатит, пневмонит, такой
 как лимфоидный интерстициальный пневмонит (LIP), облитерирующий бронхиолит
 20 (не зависимый от трансплантата) в противоположность NSIP, синдром Гийена-Барре,
 болезнь Бергера (IgA-нефропатию), идиопатическую IgA-нефропатию, линейный IgA-
 дерматоз, острый фебрильный нейтрофильный дерматоз, субкорнеальный пустулезный
 дерматоз, транзиторный акантолитический дерматоз, цирроз, такой как первичный
 билиарный цирроз, пневмоцирроз, синдром аутоиммунной энтеропатии, глютеиновую
 25 болезнь, целиакию, брюшные афты (глютеиновую энтеропатию), рефрактерные афты,
 идиопатические афты, криоглобулинемию, такую как смешанная криоглобулинемия,
 боковой амиотрофический склероз (ALS; болезнь Лу Геринга), болезнь коронарных
 артерий, аутоиммунное заболевание уха, такое как аутоиммунное заболевание
 внутреннего уха (AIED), аутоиммунную потерю слуха, полихондрит, такой как
 30 рефрактерный или рецидивирующий полихондрит, легочно-альвеолярный протеиноз,
 кератит, такой как синдром Когана/несифилитический интерстициальный кератит,
 паралич Белла, болезнь/синдром Свита, аутоиммунные красные угри, связанная с
 опоясывающим лишаем боль, амилоидоз, незлокачественный лимфоцитоз, первичный
 лимфоцитоз, который включает моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например,
 35 доброкачественную моноклональную гаммапатию и моноклональную гаммапатию
 неясного значения, MGUS), периферическую невропатию, паранеопластический синдром,
 каналопатии, такие как эпилепсия, мигрень, аритмия, мышечные нарушения, глухота,
 слепота, пароксизмальный паралич, и каналопатии ЦНС, аутизм, воспалительную
 миопатию, очаговый или сегментный или очаговый сегментный гломерулосклероз
 40 (FSGS), эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, хориоретинит, аутоиммунное
 гепатологическое нарушение, фибромиалгию, множественную эндокринную
 недостаточность, синдром Шмидта, адреналит, атрофию желудка, пресенильную
 деменцию, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные
 демиелинизирующие заболевания и хроническая демиелинизирующая полиневропатия,
 45 синдром Дресслера, очаговую алопецию, тотальную алопецию, синдром CREST
 (кальциноз, синдром Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и
 телеангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, например, вследствие
 антител против сперматозоидов, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь

Чагаса, ревматическую атаку, повторяющийся выкидыш, альвеолит у
 сельскохозяйственных рабочих, полиформную эритему, посткардиотомический синдром,
 синдром Кушинга, легочную аллергию птицеловов, аллергический гранулематозный
 ангиит, доброкачественный лимфоцитарный ангиит, синдром Альпорта, альвеолит,
 5 такой как аллергический альвеолит и фиброзный альвеолит, интерстициальное
 заболевание легкого, трансфузионную реакцию, лепру, малярию, паразитарные
 заболевания, такие как лейшманиоз, кипаносомоз, шистосомоз, аскариоз, аспергиллез,
 синдром Самптера, синдром Каплана, денге, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз,
 10 диффузный интерстициальный фиброз легких, интерстициальный фиброз легких,
 фиброзирующий медиастит, фиброз легких, идиопатический фиброз легких, кистозный
 фиброз, эндофтальмит, возвышенную стойкую эритему, гемолитическую болезнь
 новорожденных, эозинофильный фасцит, синдром Шулмана, синдром Фелти,
 филариоз, циклит, такой как хронический циклит, гетерохронический циклит,
 иридоциклит (острый или хронический), или циклит Фукса, пурпуру Геноха-Шенлейна,
 15 инфекцию вирусом иммунодефицита человека (HIV), SCID, синдром приобретенного
 иммунодефицита (СПИД), инфекцию эховирусом, сепсис (синдром системного
 воспалительного ответа (SIRS)), эндотоксемию, панкреатит, тироксикоз, инфекцию
 парвовирусом, инфекцию вирусом краснухи, поствакцинальный синдром, врожденную
 инфекцию вирусом краснухи, инфекцию вирусом Эпштейна-Барр, паротит, синдром
 20 Эванса, аутоиммунную недостаточность половых желез, хорею Сиденгама,
 постстрептококковый нефрит, облитерирующий тромбоангиит, тиреотоксикоз, сухотку
 спинного мозга, хориоидит, гигантоклеточную полимиалгию, хронический пневмонит
 с гиперчувствительностью, конъюнктивит, такой как весенний катар, сухой
 кератоконъюнктивит и эпидемический кератоконъюнктивит, идиопатический
 25 нефритический синдром, нефропатию с минимальными изменениями, повреждение
 доброкачественное семейное и при ишемии-реперфузии, реперфузию
 трансплантированного органа, аутоиммунную реакцию в сетчатке, воспаление сустава,
 бронхит, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей/легких, силикоз,
 афты, афтозный стоматит, артериосклеротические нарушения (сосудистую
 30 недостаточность головного мозга), такие как артериосклеротическая энцефалопатия
 и артериосклеротическая ретинопатия, асперматогенез, аутоиммунный гемолиз, болезнь
 Бека, криоглобулинемию, контрактура Дюпюитрена, факоанафилактический
 эндофтальмит, аллергический энтерит, узловатую лепрозную эритему, идиопатический
 паралич лицевого нерва, синдром хронической усталости, ревматическую лихорадку,
 35 болезнь Хеммена-Рича, сенсоневральную потерю слуха, пароксизмальную
 гемоглобинурию, гипогонадизм, регионарный илеит, лейкопению, инфекционный
 мононуклеоз, поперечный миелит, первичную идиопатическую микседему, нефроз,
ophthalmia sympathica (симпатическую офтальмию), офтальмию новорожденных,
 оптический неврит, гранулематозный орхит, панкреатит, острый полирадикулит,
 40 гангренозную пиодермию, тиреоидит Кервена, приобретенную атрофию селезенки,
 незлокачественную лимфому, лимфофолликулярный тимус, витилиго, синдром
 токсического шока, пищевое отравление, состояния, вовлекающие инфильтрацию Т-
 клеток, дефицит адгезии лейкоцитов, иммунные ответы, ассоциированные с острой и
 замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами,
 45 заболевания вовлекающие диapedез лейкоцитов, синдром полиорганного поражения,
 опосредуемые комплексами антиген-антитело заболевания, заболевания, направленные
 против мембраны клубочков, аутоиммунные полиневропатии, оофорит, первичную
 микседему, аутоиммунный атрофический гастрит, ревматические заболевания,

смешанное заболевание соединительной ткани, нефротический синдром, инсулит, полиэндокринную недостаточность, аутоиммунные полиглангулярные синдромы, включая аутоиммунный полиглангулярный синдром I типа, идиопатический гипопаратиреоз взрослых (АОИВ), кардиомиопатию с дилатацией, приобретенный буллезный эпидермолиз (ЕВА), гемохромацитоз, миокардит, нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный или негнойный синусит, острый или хронический синусит, синусит решетчатой кости, лобной кости, верхней челюсти или клиновидной кости, связанное с эозинофилами нарушение, такое как эозинофилия, эозинофилия с инфильтрацией в легкие, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Леффлера, хроническую эозинофильную пневмонию, тропическую легочную эозинофилию, бронхолегочный аспергиллез, аспергиллому, или содержащие эозинофилы гранулемы, анафилаксию, серонегативный спондилоартрит, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, хронический кожно-слизистый кандидоз склеры и эписклеры, синдром Брутона, транзиторную гаммаглобулинемию новорожденных, синдром Вискотта-Олдрича, атаксию-телеангиэктазию, аутоиммунные нарушения, ассоциированные с коллагеновыми заболеваниями, ревматизм, такой как хронический артрит, ревматизм, лимфаденит, снижение ответа кровяного давления, сосудистую дисфункцию, тканевое повреждение, сердечно-сосудистую ишемию, гипералгезию, церебральную ишемию и заболевание, сопровождающее васкуляризацию, аллергические нарушения, связанные с гиперчувствительностью, гломерулонефрит, ишемическое реперфузионное нарушение, реперфузионное повреждение миокарда и других тканей, лимфоматозный трахеобронхит, воспалительный дерматоз, дерматоз с острыми воспалительными компонентами, полиорганную недостаточность, буллезные заболевания, кортикальный некроз почек, острый гнойный менингит или другие воспалительные нарушения центральной нервной системы, глазные и орбитальные воспалительные нарушения, синдромы, ассоциированные с трансфузией гранулоцитов, индуцированную цитокинами токсичность, нарколепсию, острое тяжелое воспаление, пиелит, энтертериальную гиперплазию, язву желудка, вальвулит и эндометриоз. В настоящем документе предусматриваются, что такие заболевания можно лечить путем введения антитела, направленного против маркера В-клеточной поверхности, такого как CD79b, и оно включает введение неконъюгированного ("голого") антитела или антитела, конъюгированного с цитотоксическим средством, как описано в настоящем документе. Также в настоящем документе предусматривается, что такие заболевания можно лечить комбинированной терапией, включающей антитело против CD79b или конъюгат антитела против CD79b с лекарственным средством по изобретению в сочетании с другим антителом или конъюгатом антитела и лекарственного средства, другим цитотоксическим средством, лучевой терапией или другим способом лечения, проводимым одновременно или последовательно.

"Проведение лечения" или "лечение" или "смягчение течения" относится как к терапевтическим, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предотвратить или замедлить (уменьшить) намеченное патологическое состояние или нарушение. Индивиды, нуждающиеся в лечении, включают индивидов, уже имеющих нарушение, а также индивидов, имеющих предрасположенность к нарушению, или индивидов у которых нарушение подлежит профилактике. Индивиды или млекопитающее успешно "лечат" от экспрессирующей полипептид CD79b злокачественной опухоли, если после получения терапевтического количества антитела против CD79b способами по настоящему изобретению, у пациента наблюдают заметное и/или поддающееся измерению снижение или отсутствие одного или нескольких из

следующих: снижение количества злокачественных клеток или отсутствие злокачественных клеток; снижение размера опухоли; ингибирование (т.е., замедление до некоторой степени и предпочтительно остановка) инфильтрации злокачественных клеток в периферические органы, включая распространение злокачественной опухоли в мягкую ткань и кость; ингибирование (т.е., замедление до некоторой степени и предпочтительно остановка) метастазирования опухолей; ингибирование, до некоторой степени, роста опухоли; и/или смягчение, до некоторой степени, одного или нескольких симптомов, ассоциированных с конкретной злокачественной опухолью; снижение заболеваемости или смертности, и улучшение качества жизни. В зависимости от того, может ли антитело против CD79b предотвращать рост и/или уничтожать существующие злокачественные клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Снижение этих признаков или симптомов также может ощущаться пациентом.

Указанные выше параметры для оценки успешного лечения и улучшения заболевания легко определять общепринятыми способами, известными терапевту. Для терапии злокачественной опухоли, эффективность можно определять, например, посредством оценки времени до прогрессирования заболевания (TTP) и/или определения скорости ответа (RR). Метастазирование можно определять посредством определения стадии заболевания и посредством сканирования костей и тестов уровня кальция и других ферментов для определения распространения в кость. Также для поиска распространения в таз и лимфатические узлы в данной области можно получать СТ-изображения. Рентгенографию грудной клетки и измерение уровней ферментов печени известными способами используют для поиска метастазов в легкие и печень, соответственно. Другие общепринятые способы мониторинга заболевания включают трансректальную ультразвуковую эхографию (TRUS) и трансректальную пункционную биопсию (TRNB).

Для рака мочевого пузыря, который представляет собой более локализованную злокачественную опухоль, способы определения прогрессирования заболевания включают цитологическую оценку мочи цистоскопией, мониторинг наличия крови в моче, визуализацию уретериального тракта с помощью ультразвукового исследования или внутривенную пиелографию, компьютерную томографию (СТ) и магнитно-резонансную томографию (MRI). Наличие отдаленных метастазов можно оценивать посредством СТ живота, рентгенографии грудной клетки или радионуклидной визуализации скелета.

"Длительное" введение относится к введению средства(средств) постоянно в противоположность кратковременному режиму, чтобы поддерживать исходный терапевтический эффект (активность) в течение длительного периода времени. "Прерывающееся" введение представляет собой лечение, которое не проводится без прерывания, а вместо этого является циклическим.

"Индивид" представляет собой позвоночное. В определенных вариантах осуществления, позвоночным является млекопитающее. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных, домашних животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс. В определенных вариантах осуществления, млекопитающим является человек.

"Млекопитающее" для целей лечения, смягчения симптомов злокачественной опухоли относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая человека, домашних и сельскохозяйственных животных, и животных зоопарков, спортивных животных, или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, свиньи, кролики и т.д. Предпочтительно, млекопитающее представляет собой

человека.

Введение "в сочетании с" одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами включает одновременное (совместное) и последовательное введение в любом порядке.

Как используют в настоящем документе, "носители" включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, подвергаемых их воздействию, в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; спирты сахаров, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN[®],

полиэтиленгликоль (PEG) или PLURONICS[®].

Под "твердой фазой" или "твердой подложкой" подразумевают неводную матрицу, на которую антитело против CD79b может прикрепляться или связываться. Примеры твердой фазы, охватываемые в настоящем документе, включают твердую фазу, образованную частично или полностью из стекла (например, стекла с контролируемым размером пор), полисахаридов (например, агарозы), полиакриламидов, полистирола, поливинилового спирта и силиконов. В определенных вариантах осуществления, в зависимости от контекста, твердая фаза может включать лунку планшета для анализа; в других вариантах осуществления, она представляет собой колонку для очистки (например, колонку для аффинной хроматографии). Также этот термин включает дисперсную твердую фазу из дискретных частиц, такую как твердая фаза, описанная в патенте США No. 4275149.

"Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые пригодны для доставки лекарственного средства (такого как антитело против CD79b) млекопитающему. Компоненты липосомы обычно образуют двухслойную структуру, сходную с размещением липидов биологических мембран.

"Низкомолекулярное" соединение или "низкомолекулярное" органическое соединение, как определено в настоящем документе, имеет молекулярную массу менее чем приблизительно 500 Дальтон.

"Индивид", "субъект" или "пациент" представляет собой позвоночное. В определенных вариантах осуществления, позвоночное представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных, домашних животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс. В определенных вариантах осуществления, млекопитающим является человек.

Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который имеет такую форму, чтобы обеспечить эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивида, которому состав будут вводить. Такой состав

может быть стерильным.

"Стерильный" состав является асептическим или не содержит живых микроорганизмов и их спор.

"Эффективное количество" антитела, описанного в настоящем документе, представляет собой количество, достаточное для осуществления конкретной поставленной цели. "Эффективное количество" можно определять эмпирически и общепринятыми способами, в зависимости от поставленной цели.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела или другого лекарственного средства, эффективному для "лечения" заболевания или нарушения у индивида или млекопитающего. В случае злокачественной опухоли, терапевтически эффективное количество лекарственного средства может снижать количество злокачественных клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т.е., замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; ингибировать (т.е., замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или смягчать до некоторой степени один или несколько симптомов, ассоциированных со злокачественной опухолью. См. определение "лечения" в настоящем документе. В зависимости от того, может ли лекарственное средство препятствовать росту и/или уничтожать существующие злокачественные клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному, в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени, для достижения требуемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу используют у индивидов до заболевания или на его ранних стадиях, профилактически эффективное количество будет меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

"Ингибирующее рост количество" антитела против CD79b представляет собой количество, способное ингибировать рост клетки, особенно опухолевой, например, злокачественной клетки, либо *in vitro*, либо *in vivo*. "Ингибирующее рост количество" антитела против CD79b для целей ингибирования неопластического клеточного роста можно определять эмпирически и общепринятыми способами.

"Цитотоксическое количество" антитела против CD79b представляет собой количество, способное вызывать разрушение клетки, особенно опухолевой, например, злокачественной клетки, либо *in vitro*, либо *in vivo*. "Цитотоксическое количество" антитела против CD79b для целей ингибирования неопластического роста клеток можно определять эмпирически и общепринятыми способами.

"Экспрессирующая CD79b клетка" представляет собой клетку, которая экспрессирует эндогенный или трансфицированный полипептид CD79b либо на клеточной поверхности, либо в секретируемой форме. "Экспрессирующая CD79b злокачественная опухоль" представляет собой злокачественную опухоль, содержащую клетки, которые имеют полипептид CD79b, представленный на клеточной поверхности, или которые продуцируют и секретируют полипептид CD79b. "Экспрессирующая CD79b злокачественная опухоль" необязательно продуцирует достаточные уровни полипептида CD79b на поверхности ее клеток, чтобы антитело против CD79b могло связаться с ним и оказывать терапевтический эффект в отношении злокачественной опухоли. В другом варианте осуществления, "экспрессирующая CD79b злокачественная опухоль" необязательно продуцирует и секретирует достаточные уровни полипептида CD79b, так чтобы антитело-антагонист против CD79b могло связываться с ним и иметь

терапевтический эффект в отношении злокачественной опухоли. В отношении последнего, антагонист может представлять собой антисмысловой олигонуклеотид, который снижает, ингибирует или предотвращает продукцию и секрецию секретируемого полипептида CD79b опухолевыми клетками. Злокачественная опухоль, которая

5 "сверхэкспрессирует" полипептид CD79b представляет собой опухоль, которая имеет, или продуцирует и секретирует, значительно более высокие уровни полипептида CD79b на своей клеточной поверхности, по сравнению с незлокачественной клеткой ткани того же типа. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией гена или повышенной транскрипцией или трансляцией. Сверхэкспрессию полипептида CD79b
10 можно определять в анализе для детекции или прогноза путем оценки повышенных уровней белка CD79b, присутствующего на поверхности клетки, или секретируемого клеткой (например, с помощью иммуногистохимического анализа с использованием антител против CD79b, полученных против выделенного полипептида CD79b, который можно получать с использованием технологии рекомбинантных ДНК из выделенной
15 нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CD79b; анализа FACS и т.д.).

Альтернативно или дополнительно, можно измерять уровни кодирующей полипептид CD79b нуклеиновой кислоты или мРНК в клетке, например, посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием зонда на основе нуклеиновой кислоты, соответствующего кодирующей CD79b нуклеиновой кислоте или комплементарной ей
20 последовательности; (FISH; см. WO98/45479, опубликованную в октябре 1998 года), Саузерн-блоттинг, Нозерн-блоттинг или способы полимеразной цепной реакции (ПЦР), такие как количественная ПЦР с детекцией в реальном времени (RT-PCR). Также можно исследовать сверхэкспрессию полипептида CD79b путем измерения отделяющегося от клетки антигена в биологической жидкости, такой как сыворотка, например, с
25 использованием анализов на основе антител (также см., например, патент США No. 4933294, выданный 12 июня 1990 года; WO91/05264, опубликованную 18 апреля 1991 года; патент США 5401638, выданный 28 марта 1995 года; и Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Помимо указанных выше анализов, специалисту в данной области доступны различные анализы *in vivo*. Например, можно воздействовать на клетки в
30 организме пациента антителом, которое необязательно является меченым поддающейся детекции меткой, например, радиоактивным изотопом, и можно оценивать связывание антитела с клетками пациента, например, путем внешнего сканирования на радиоактивность или путем анализа биоптата, взятого у пациента, на которого ранее воздействовали антителом.

35 Как используют в настоящем документе, термин "иммуноадгезин" означает подобные антителу молекулы, которые сочетают специфичность связывания гетерологичного белка ("адгезин") с эффекторными функциями константных доменов иммуноглобулинов. Структурно иммуноадгезины содержат аминокислотную последовательность с требуемой специфичностью связывания, отличающуюся от участка распознавания
40 антигена и участка связывания антитела (т.е., являющуюся "гетерологичной"), слитую с последовательностью константного домена иммуноглобулина. Часть адгезина в молекуле иммуноадгезина, как правило, представляет собой непрерывную аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере участок связывания рецептора или лиганда. Последовательность константного домена иммуноглобулина
45 в иммуноадгезине может быть получена из любого иммуноглобулина, такого как изотипы IgG-1, IgG-2, IgG-3 или IgG-4, IgA (включая IgA-1 и IgA-2), IgE, IgD или IgM.

Слово "метка", при использовании в настоящем документе, относится к поддающемуся детекции соединению или композиции, которые конъюгированы прямо

или непрямо с антителом, с образованием "меченого" антитела. Метка сама может быть поддающейся детекции (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментной метки, она может катализировать химическое изменение соединения или композиции субстрата, которые поддаются детекции.

5 Термин "цитотоксическое средство", как используют в настоящем документе, относится к веществу, которое ингибирует функционирование клеток, или препятствует ему, и/или вызывает разрушение клеток. Подразумевают, что термин включает радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства, например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие вещества, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые средства или средства против злокачественной опухоли, как описано ниже. Другие цитотоксические средства описаны ниже. Уничтожающее опухолевые клетки средство вызывает разрушение опухолевых клеток.

20 "Токсин" представляет собой любое вещество, способное оказывать вредный эффект на рост или пролиферацию клетки.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, полезное при лечении злокачественной опухоли, независимо от механизма его действия. Классы химиотерапевтических средств включают, но не ограничиваются ими: алкилирующие средства, антиметаболиты, ядовитые для веретена деления алкалоиды растений, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназ. Химиотерапевтические средства включают соединения, используемые в "направленной терапии" и в общепринятой химиотерапии. Примеры химиотерапевтических средств включают: эрлотиниб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS No. 51-21-8), гемцитабин (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диаминдихлорплатина(II), CAS No. 15663-27-1), карбоплатин (CAS No. 41575-94-4), паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло[4.3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-N,N-диметилэтанамин, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), и доксорубицин (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD и рапамицин.

Другие примеры химиотерапевтических средств включают: оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезомиб (VELCADE®, Millennium Pharm.), сутент (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), иматиниба мезилат (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (SARASARTM, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®,

AstraZeneca), иринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), типифарниб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (не содержащий кремофора), сконструированный с альбумином состав паклитаксела в виде наночастиц (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), вандетаниб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролимус (TORISEL®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (TELCYTA®, Telik), тиотепу и циклофосфамид (CYTOXANE®, NEOSAR®); алкилсульфонаты, такие как бисульфат, импросульфат и пипосульфат; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги на основе адозелезина, карзелезина и бизелезина); криптофицины (в частности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая его синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, иприт урацила; нитрозомочевину, такую как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма I и калихеамицин омега I (Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор на основе неокарциностатина и сходные хромопротеиновые хромофоры на основе эндиинового антибиотика, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, декторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиюганин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антиадренальные средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средства для восполнения фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофирин; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, рорицин А и ангвидин); уретан;

виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепу; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; капецитабин (XELODA®, Roche); ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из указанных выше.

Также в определение "химиотерапевтическое средство" включены: (i)

- антигормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормона на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (в том числе NOLVADEX®; тамоксифена цитрат), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® (торемифина цитрат); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, например, такие как 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, MEGASE® (магестрола ацетат), AROMASIN® (экземестан; Pfizer), форместан, фадрозол, RIVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол; Novartis), и ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); (iv) ингибиторы протеинкиназ, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы киназ липидов; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, в частности олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессии генов каскадов передачи сигнала, вовлеченных в измененную пролиферацию клеток, например, PKC-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимержен (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например, ANGIOZYME®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® и VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы I, такие как LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; (ix) антиангиогенные средства, такие как бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из указанных выше.

Также в определение "химиотерапевтическое средство" включены антитела, такие как алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (АВАСТИН®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панитумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб (OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), тозитумомаб (Bexxar, Corixa), и конъюгат антитела и лекарственного средства, гемтузумаб озогамидин (MYLOTARG®, Wyeth).

- "Ингибирующее рост средство", при применении в настоящем документе, относится к соединению или композиции, которые ингибируют рост клетки, особенно экспрессирующей CD79b злокачественной клетки, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство может представлять собой средство, которое значительно снижает процентное количество экспрессирующих CD79b клеток в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, которые блокируют прогрессирование клеточного цикла (в месте, отличном от S-фазы), такие как средства, которые индуцируют остановку в G1-фазе и остановку в M-фазе. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Те средства, которые вызывают остановку в G1-фазе, также

вовлекают остановку в S-фазе, например, алкилирующие ДНК средства, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.

Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой лекарственные средства против злокачественной опухоли, полученные из тисового дерева. Доцетаксел

(TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer), полученный из тиса европейского, представляет

собой полусинтетический аналог паклитаксела (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb).

Паклитаксел и доцетаксел обеспечивают сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки, препятствуя деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

"Доксорубицин" представляет собой антрациклиновый антибиотик. Полное

химическое название доксорубина представляет собой (8S-цис)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксид- α -L-ликсогогексапиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион.

Термин "цитокин" является общим термином для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые воздействуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. Цитокины включают гормоны роста, такие как гормон роста человека, гормон роста человека с N-метионилом и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреоидстимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); печеночный фактор роста; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухолей- α и - β ; ингибирующее вещество Мюллера; гонадотропин-ассоциированный пептид мыши; ингибин; активин; сосудисто-эндотелиальный фактор роста; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF- β ; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β ; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ ; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; фактор некроза опухолей, такой как TNF- α или TNF- β ; и другие полипептидные факторы, в том числе LIF и kit-лиганд (KL). Как используют в настоящем документе, термин цитокин включает белки из природных источников или из рекомбинантных клеточных культур и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

Термин "вкладыш в упаковку" используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях, и/или предупреждения, касающиеся применения таких терапевтических продуктов.

Термин "внутриклеточный метаболит" относится к соединению, образующемуся при метаболическом процессе или реакции конъюгата антитело-лекарственное средство внутри клетки (ADC). Метаболический процесс или реакция может представлять собой ферментативный процесс, такой как протеолитическое расщепление пептидного линкера в ADC, или гидролиз функциональной группы, такой как гидразон, сложный эфир или амид. Внутриклеточные метаболиты включают, но не ограничиваются ими, антитела

и свободное лекарственное средство, которое претерпели внутриклеточное расщепление после проникновения, диффузии, захвата или транспорта в клетку.

Термины "внутриклеточно расщепленный" и "внутриклеточное расщепление" относятся к метаболическому процессу или реакции внутри клетки на конъюгате антитело-лекарственное средство (ADC), посредством которого разрушается ковалентная связь, т.е. линкер, между группой лекарственного средства (D) и антителом (Ab), вызывая диссоциацию свободного лекарственного средства от антитела внутри клетки. Расщепленные группы ADC, таким образом, являются внутриклеточными метаболитами.

Термин "биодоступность" относится к системной доступности (т.е., уровням в крови/плазме) данного количества лекарственного средства, введенного пациенту. Биодоступность представляет собой абсолютный показатель для введенной дозированной формы, который указывает на меру как времени (скорости), так и общего количества (степени) лекарственного средства, которое достигает общего кровотока.

Термин "цитотоксическая активность" относится к эффекту уничтожения клеток, цитостатическому или ингибирующему рост эффекту ADC или внутриклеточного метаболита ADC. Цитотоксическая активность может быть выражена в качестве значения IC₅₀, которое представляет собой концентрацию (молярную или массовую) на единицу объема, при которых выживает половина клеток.

Термин "алкил", как используют в настоящем документе, относится к насыщенному линейному или разветвленному одновалентному углеводородному радикалу из одного до двенадцати атомов углерода (C₁-C₁₂), где алкильный радикал необязательно может быть замещен независимо одним или несколькими заместителями, описанными ниже. В другом варианте осуществления, алкильный радикал имеет от одного до восьми атомов углерода (C₁-C₈), или от одного до шести атомов углерода (C₁-C₆). Примеры алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил (Me, -CH₃), этил (Et, -CH₂CH₃), 1-пропил (n-Pr, н-пропил, -CH₂CH₂CH₃), 2-пропил (i-Pr, изопропил, -CH(CH₃)₂), 1-бутил (n-Bu, н-бутил, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-метил-1-пропил (i-Bu, изобутил, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-бутил (s-Bu, втор-бутил, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-метил-2-пропил (t-Bu, трет-бутил, -C(CH₃)₃), 1-пентил (н-пентил, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-пентил (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-пентил (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-метил-2-бутил (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-метил-2-бутил (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-метил-1-бутил (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-метил-1-бутил (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-гексил (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-гексил (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-гексил (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-метил-2-пентил (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-метил-2-пентил (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-метил-2-пентил (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-метил-3-пентил (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-метил-3-пентил (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-диметил-2-бутил (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-диметил-2-бутил (-CH(CH₃)C(CH₃)₃), 1-гептил, 1-октил и т.п.

Термин "алкенил" относится к линейному или разветвленному одновалентному углеводородному радикалу из от двух до восьми атомов углерода (C₂-C₈) по меньшей мере с одним участком ненасыщенности, т.е., углерод-углеродной sp²-двойной связью, где алкенильный радикал необязательно может быть замещен независимо одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе, и включает радикалы,

имеющие "цис"- и "транс"-ориентацию, или альтернативно "Е"- и "Z"-ориентацию. Примеры включают, но не ограничиваются ими, этиленил или винил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), аллил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) и т.п.

Термин "алкинил" относится к линейному или разветвленному одновалентному углеводородному радикалу из от двух до восьми атомов углерода ($\text{C}_2\text{-C}_8$) по меньшей мере с одним участком ненасыщенности, т.е., углерод-углеродной sp -тройной связью, где алкинильный радикал необязательно может быть независимо замещен одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе. Примеры включают, но не ограничиваются ими, этинил ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), пропинил (пропаргил, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) и т.п.

Термины "карбоцикл", "карбоциклил", "карбоциклическое кольцо" и "циклоалкил" относятся к одновалентному неароматическому, насыщенному или частично ненасыщенному кольцу, имеющему от 3 до 12 атомов углерода ($\text{C}_3\text{-C}_{12}$) в виде моноциклического кольца, или от 7 до 12 атомов углерода в виде бициклического кольца. Бициклические карбоциклы, имеющие от 7 до 12 атомов, можно представить, например, как систему бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6], и бициклические карбоциклы, имеющие 9 или 10 атомов в кольце можно представить как систему бицикло [5,6] или [6,6], или как системы с мостиками, такие как бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[2.2.2]октан и бицикло[3.2.2]нонан. Примеры моноциклических карбоциклов включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогексадиенил, циклогептил, циклооктил, циклононил, циклодецил, циклоундецил, циклододецил и т.п.

"Арил" означает одновалентный ароматический углеводородный радикал из 6-20 атомов углерода ($\text{C}_6\text{-C}_{20}$), образованный удалением одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представляют в иллюстративных структурах как "Ar". Арил включает бициклические радикалы, содержащие ароматическое кольцо, конденсированное с насыщенным частично ненасыщенным или ароматическим карбоциклическим кольцом. Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются ими, радикалы, образованные из бензола (фенила), замещенных бензолов, нафталина, антрацена, бифенила, инденила, инданила, 1,2-дигидронафталина, 1,2,3,4-тетрагидронафтила и т.п. Арильные группы необязательно замещены независимо одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе.

Термины "гетероцикл", "гетероциклил" и "гетероциклическое кольцо" используют в настоящем документе взаимозаменяемо и они относятся к насыщенному или частично ненасыщенному (т.е., имеющему одну или несколько двойных и/или тройных связей в кольце) карбоциклическому радикалу из от 3 до 20 атомов в кольце, в котором по меньшей мере один атом кольца представляет собой гетероатом, выбранный из азота, кислорода, фосфора и серы, а остальные атомы кольца представляют собой C, где один или несколько атомов кольца необязательно замещены независимо одним или несколькими заместителями, описанными ниже. Гетероцикл может представлять собой моноцикл, имеющий от 3 до 7 членов в кольце (от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), или бицикл, имеющий от 7 до 10 членов в кольце (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 6 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: система бицикло [4,5], [5,5], [5,6], или [6,6]. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), в частности, главы 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of

Monographs" (John Wiley & Sons, New York, с 1950 по настоящее время), в частности тома 13, 14, 16, 19, и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Гетероцикл" также включает радикалы, где гетероциклические радикалы являются конденсированными с насыщенным, частично ненасыщенным кольцом или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Примеры гетероциклических колец включают, но не ограничиваются ими, пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротииенил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидротииопиранил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, гомопиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиэтанил, гомопиперидинил, оксепанил, тиэпанил, оксазепинил, диазепинил, тиазепинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2Н-пиранил, 4Н-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротииенил, дигидрофуранил, пиразолидинилимидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0]гептанил, азабицикло[2.2.2]гексанил, 3Н-индолилхинолизинил и N-пиридинильные соединения мочевины. Также в объем этого определения включены спирогруппы. Примерами гетероциклической группы, где 2 атома углерода кольца замещены оксогруппами (=O), являются пиримидинонил и 1,1-диоксотииоморфолинил. Гетероциклические группы, описанные в настоящем документе, необязательно замещены независимо одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе.

Термин "гетероарил" относится к одновалентному ароматическому радикалу 5-, 6- или 7-членных колец, и включает конденсированные кольцевые системы (по меньшей мере одна из которых является ароматической) из 5-20 атомов, содержащие один или несколько гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Примерами гетероарильных групп являются пиридинил (включая, например, 2-гидроксипиридинил), имидазолил, имидазопиридинил, пиримидинил (включая, например, 4-гидроксиимидазопиридинил), пиразолил, триазолил, пиразинил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксазолил, изотиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолизинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, птеридинил, пуринил, оксадиазолил, триазолил, тиадиазолил, тиадиазолил, фуразанил, бензофуразанил, бензотииофенил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил и фуропиридинил. Гетероарильные группы необязательно замещены независимо одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе.

Гетероциклические или гетероарильные группы могут быть связанными атомами углерода (углерод-связанные), или азота (азот-связанные), когда это возможно. В качестве неограничивающего примера, связанные атомами углерода гетероциклы или гетероарилы связаны во 2, 3, 4, 5 или 6 положении пиридина, 3, 4, 5 или 6 положении пиридазина, 2, 4, 5 или 6 положении пиримидина, 2, 3, 5 или 6 положении пиразина, 2, 3, 4 или 5 положении фурана, тетрагидрофурана, тииофурана, тииофена, пиррола или тетрагидропиррола, 2, 4 или 5 положении оксазола, имидазола или тиазола, 3, 4 или 5 положении изоксазола, пиразола или изотиазола, 2 или 3 положении азиридина, 2, 3 или 4 положении азетидина, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 положении хинолина или 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 положении изохинолина.

В качестве неограничивающего примера, связанные азотом гетероциклы или гетероарилы связаны в 1 положении азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазопиридина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина, 1Н-индазола, 2 положении изоиндола или изоиндолина, 4 положении

морфолина, и 9 положении карбазола или β -карболина.

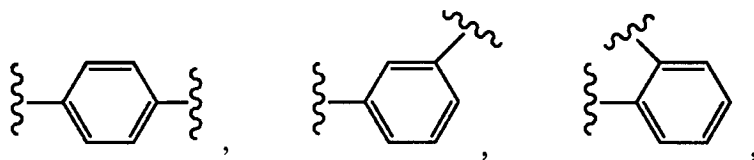
"Алкилен" относится к насыщенному разветвленному или неразветвленному или циклическому углеводородному радикалу из 1-18 атомов углерода, имеющему два центра в виде одновалентных радикалов, образованные удалением двух атомов водорода с одного или с двух различных атомов углерода исходного алкана. Типичные алкиленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: метилен ($-\text{CH}_2-$) 1,2-этил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-пропил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-бутил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) и т.п.

" C_1 - C_{10} алкилен" представляет собой неразветвленную насыщенную углеводородную группу формулы $-(\text{CH}_2)_{1-10}$. Примеры C_1 - C_{10} алкилена включают метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен и декален.

"Алкенилен" относится к ненасыщенному разветвленному или неразветвленному или циклическому углеводородному радикалу из 2-18 атомов углерода, имеющему два центра в виде одновалентных радикалов, образованных удалением двух атомов водорода от одного или двух различных атомов углерода исходного алкена. Типичные алкениленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: 1,2-этилен ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

"Алкинилен" относится к ненасыщенному разветвленному или неразветвленному или циклическому углеводородному радикалу из 2-18 атомов углерода, имеющему два центра в виде одновалентных радикалов, образованных удалением двух атомов водорода от одного или двух различных атомов углерода исходного алкина. Типичные алкиниленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: ацетилен ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), пропаргил ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), и 4-пентинил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$).

"Арилен" представляет собой арильную группу, которая имеет две ковалентные связи и может находиться в орто-, мета- или пара-конфигурации, как показано на следующих структурах:



в которых фенильная группа может быть незамещенной или замещена посредством вплоть до четырех групп, включая, но не ограничиваясь ими, $-\text{C}_1$ - C_8 алкил, $-\text{O}-$ (C_1 - C_8 алкил), -арил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, -галоген, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ и $-\text{CN}$; где каждый R' независимо выбран из H , $-\text{C}_1$ - C_8 алкила и арила.

"Арилалкил" относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, как правило, концевым или sp^3 -атомом углерода, замещен арильным радикалом. Типичные арилалкильные группы включают, но не ограничиваются ими, бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и т.п. Арилалкильная группа содержит от 6 до 20 атомов углерода, например, алкильная группа, включая алканильную, алкенильную или алкинильную группы, арилалкильной группы имеет от 1 до 6 атомов углерода, а арильная группа имеет от 5 до 14 атомов углерода.

"Гетероарилалкил" относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, как правило, концевым или

sp³-атомом углерода, замещен гетероарильным радикалом. Типичные гетероарилалкильные группы включают, но не ограничиваются ими, 2-бензимидазолилметил, 2-фурилэтил и т.п. Гетероарилалкильная группа содержит от 6 до 20 атомов углерода, например, алкильная группа, включая алканильную, алкенильную или алкинильную группы, гетероарилалкильной группы имеет от 1 до 6 атомов углерода, а гетероарильная группа имеет от 5 до 14 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. Гетероарильная группа гетероарилалкильной группы может представлять собой моноцикл, имеющий от 3 до 7 членов в кольце (от 2 до 6 атомов углерода) или бицикл, имеющий от 7 до 10 членов в кольце (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: систему бицикло [4,5], [5,5], [5,6], или [6,6].

Термин "пролекарство", как используют в настоящей заявке, относится к форме предшественника или производного соединения по изобретению, которая может быть менее цитотоксической для клеток по сравнению с исходным соединением или лекарственным средством и может быть ферментативно или гидролитически активирована или превращена в более активную исходную форму. См., например, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) и Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Пролекарства по этому изобретению включают, но не ограничиваются ими, содержащие фосфат пролекарства, содержащие тиофосфат пролекарства, содержащие сульфат пролекарства, содержащие пептид пролекарства, пролекарства с модифицированными D-аминокислотами, гликозилированные пролекарства, содержащие β-лактамы пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид пролекарства, содержащие необязательно замещенный фенилацетамид пролекарства, пролекарства с 5-фторцитозином и другие пролекарства с 5-фторуридином, которые могут превращаться в более активное цитотоксическое свободное лекарственное средство. Примеры цитотоксических лекарственных средств, которые могут быть преобразованы в форму пролекарства для применения в этом изобретении, включают, но не ограничиваются ими, соединения по изобретению и химиотерапевтические средства, такие как описаны выше.

"Метаболит" представляет собой продукт, образующийся при метаболизме в организме определенного соединения или его соли. Метаболиты соединения можно идентифицировать с использованием общепринятых способов, известных в данной области, и их активность можно определять с использованием тестов, таких как тесты, описанные в настоящем документе. Такие продукты могут образовываться, например, в результате окисления, восстановления, гидролиза, амидации, дезамидации, этерификации, деэтерификации, ферментативного расщепления и т.п., введенного соединения. Таким образом, изобретение включает метаболиты соединений по изобретению, в том числе соединений, образованных путем процесса, включающего контактирование соединения по этому изобретению с млекопитающим в течение периода времени, достаточного для образования его метаболического продукта.

"Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые пригодны для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно образуют двухслойную структуру, сходную с размещением липидов биологических мембран.

"Линкер" относится к химической группе, содержащей ковалентную связь или цепь

из атомов, которые ковалентно связывают антитело с группой лекарственного средства. В различных вариантах осуществления, линкеры включают двухвалентный радикал, такой как алкилдиил, арилдиил, гетероарилдиил, группы, такие как: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, повторяющиеся элементы алкилокси (например, полиэтиленокси, PEG, полиметиленокси)

и алкиламино (например, полиэтиленамино, JeffamineTM); и сложные эфиры и амиды двухосновных кислот, включая сукцинат, сукцинамид, дигликолят, малонат и капроамид.

Термин "хиральный" относится к молекулам, которые обладают свойством несовпадения с аналогами, являющимися их зеркальным отображением, а термин "ахиральный" относится к молекулам, которые совпадают с их аналогами, являющимися их зеркальными отображениями.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые обладают идентичным химическим строением, но отличаются расположением атомов или групп в пространстве.

"Диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более хиральными центрами, молекулы которого не являются зеркальными отображениями друг друга.

Диастереомеры обладают различными физическими свойствами, например температурой плавления, температурой кипения, спектральными свойствами и реакционной способностью. Смеси диастереомеров можно разделять аналитическими способами высокого разрешения, такими как электрофорез и хроматография.

"Энантиомеры" относятся к двум стереоизомерам соединения, которые не являются совпадающими зеркальными отображениями друг друга.

Стереохимические определения и обозначения, используемые в настоящем документе, главным образом, соответствуют S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, т.е., они обладают способностью к вращению плоскости плоскополяризованного света. При описании оптически активного соединения, приставки D и L, или R и S, используют для обозначения абсолютной конфигурации молекулы в области ее хирального центра(ов). Приставки d и l или (+) и (-) используют для обозначения признака вращения плоскополяризованного света соединением, причем (-) или l означает, что соединение является левовращающим. Соединение с приставкой (+) или d является правовращающим. Для данной химической структуры эти стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они являются зеркальными отображениями друг друга. Конкретный стереоизомер также может быть обозначен как энантиомер, а смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 называют рацемической смесью или рацематом, которая может встречаться, только когда отсутствует стереоселекция или стереоспецифичность в химической реакции или процессе. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух энантиомерных соединений, лишенной оптической активности.

Термин "таутомер" или "таутомерная форма" относится к структурным изомерам с различной энергией, которые являются взаимопревращающимися с низким энергетическим барьером. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают взаимопревращения путем миграции протона, такие как кето-енольная и имин-енаминовая изомеризации. Валентные таутомеры включают взаимопревращения путем реорганизации нескольких электронов связи.

Выражение "фармацевтически приемлемая соль", как используют в настоящем документе, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по изобретению. Иллюстративные соли включают, но не

ограничиваются ими, сульфаты, цитраты, ацетаты, оксалаты, хлориды, бромиды, йодиды, нитраты, бисульфаты, фосфаты, кислые фосфаты, изоникотинаты, лактаты, салицилаты, кислые цитраты, тартраты, олеаты, таннаты, пантотенаты, битартраты, аскорбаты, сукцинаты, малеаты, гентизинаты, фумараты, глюконаты, глюкуронаты, сахараты, формиаты, бензоаты, глутаматы, метансульфонаты "мезилаты", этансульфонаты, бензолсульфонаты, п-толуолсульфонаты и памоаты (т.е., 1,1'-метиленис(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может включать другую молекулу, такую как ион ацетата, ион сукцината или другой противоион. Противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую группу, которая стабилизирует заряд на исходном соединении. Более того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в ее структуре. В случаях, когда множество заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, может существовать множество противоионов. Таким образом, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Если соединение по изобретению является основанием, требуемую фармацевтически приемлемую соль можно получать любым подходящим способом, доступным в данной области, например, обработкой свободного основания неорганической кислотой, такой как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, метансульфоновая кислота, фосфорная кислота и т.п., или органической кислотой, такой как уксусная кислота, трифторуксусная кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая кислота, малоновая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пиранозидильная кислота, такая как глюкуроновая кислота или галактуриновая кислота, альфа-гидроксикислота, такая как лимонная кислота или виннокаменная кислота, аминокислота, такая как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, ароматическая кислота, такая как бензойная кислота или коричная кислота, сульфоновая кислота, такая как п-толуолсульфоновая кислота или этансульфоновая кислота, или сходные с ними.

Если соединение по изобретению является кислотой, требуемую фармацевтически приемлемую соль можно получать любым подходящим способом, например, обработкой свободной кислоты неорганическим или органическим основанием, таким как амин (первичный, вторичный или третичный), гидроксид щелочного металла или гидроксид щелочноземельного металла или сходные с ними. Иллюстративные примеры подходящих солей включают, но не ограничиваются ими, органические соли, образованные из аминокислот, таких как глицин и аргинин, аммиака, первичных, вторичных и третичных аминов и циклических аминов, таких как пиперидин, морфолин и пиперазин, и неорганические соли, образованные из натрия, кальция, калия, магния, марганца, железа, меди, цинка, алюминия и лития.

Выражение "фармацевтически приемлемый" указывает на то, что вещество или композиция должны быть совместимы химически и/или токсикологически с другими ингредиентами, содержащимися в составе, и/или с млекопитающим, подвергаемым лечению ими.

"Сольват" относится к ассоциации или комплексу одной или нескольких молекул растворителя и соединения по изобретению. Примеры растворителей, которые образуют сольваты, включают, но не ограничиваются ими, воду, изопропанол, этанол, метанол, DMSO, этилацетат, уксусную кислоту и этаноламин. Термин "гидрат" относится к комплексу, где молекулой растворителя является вода.

Термин "защитная группа" относится к заместителю, который обычно используют для блокирования или защиты конкретной функциональной группы в ходе реакции других функциональных групп на соединении. Например, "защитная группа для amino" представляет собой заместитель, связанный с аминогруппой, который блокирует или защищает функциональную аминогруппу в соединении. Подходящие защитные группы amino включают ацетил, трифторацетил, трет-бутоксикарбонил (BOC), бензилоксикарбонил (CBZ) и 9-флуоренилметиленоксикарбонил (Fmoc). Аналогично, "защитная группа гидрокси" относится к заместителю гидроксигруппы, который блокирует или защищает функциональную гидроксигруппу. Подходящие защитные группы включают ацетил и силил. "Защитная группа карбокси" относится к заместителю карбоксигруппы, который блокирует или защищает функциональную группу карбокси. Распространенные защитные группы карбокси включают фенилсульфонилэтил, цианоэтил, 2-(триметилсилил)этил, 2-(триметилсилил)этоксиметил, 2-(п-толуолсульфонил)этил, 2-(п-нитрофенилсульфенил)этил, 2-(дифенилфосфино)этил, нитроэтил и т.п. Для общего описания защитных групп и их применения, см. T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

"Уходящая группа" относится к функциональной группе, которая может быть замещена другой функциональной группой. Определенные уходящие группы хорошо известны в данной области, и их примеры включают, но не ограничиваются ими, галогенид (например, хлорид, бромид, йодид), метансульфонил (мезил), п-толуолсульфонил (тозил), трифторметилсульфонил (трифлат) и трифторметилсульфонат.

Сокращения

ЛИНКЕРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ:

МС = 6-малеимидокапроил

Val-Cit или "vc" = валин-цитруллин (иллюстративный дипептид в расщепляемом протеазой линкере)

Цитруллин = 2-амино-5-уреидопентановая кислота

РАВ = п-аминобензилоксикарбонил (пример "самоотщепляющегося" линкерного компонента)

Me-Val-Cit = N-метил-валин-цитруллин (где пептидная связь линкера модифицирована для предотвращения ее расщепления катепсином В)

МС(PEG)6-ОН = малеимидокапроилполиэтиленгликоль (может быть связан с остатками цистеина антитела).

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА:

ММАЕ = монометилауристатин Е (MW 718)

ММАF = вариант ауристатина Е (ММАЕ) с фенилаланином на С-конце лекарственного средства (MW 731,5)

ММАF-DMAEA = ММАF с DMAEA (диметиламиноэтиламин) в амидной связи с С-концевым фенилаланином (MW 801,5)

ММАF-TEG = ММАF с тетраэтиленгликолем, этерифицированным фенилаланином
ММАF-NtBu = N-трет-бутил, связанный в качестве амида с С-концом ММАF

DM1 = N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанин

DM3 = N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-1-оксопентил)майтанин

DM4 = N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтанин

Другие сокращения являются следующими: AE представляет собой ауристатин Е, Boc представляет собой N-(трет-бутоксикарбонил), cit представляет собой цитруллин, dar представляет собой долапроин, DCC представляет собой 1,3-дициклогексилкарбодимид, DCM представляет собой дихлорметан, DEA представляет

с собой диэтиламин, DEAD представляет собой диэтилазодикарбоксилат, DEPC представляет собой диэтилфосфорилцианидат, DIAD представляет собой диизопропилазодикарбоксилат, DIEA представляет собой *N,N*-диизопропилэтиламин, diI представляет собой долаизолейцин, DMA представляет собой диметилацетамид, 5 DMAP представляет собой 4-диметиламинопиридин, DME представляет собой диметиловый эфир этиленгликоля (или 1,2-диметоксиэтан), DMF представляет собой *N,N*-диметилформамид, DMSO представляет собой диметилсульфоксид, doe представляет собой долафенин, dov представляет собой *N,N*-диметилвалин, DTNB представляет собой 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойную кислоту), DTPA представляет собой 10 диэтилентриаминпентауксусную кислоту, DTT представляет собой дитиотреитол, EDCI представляет собой 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорид, EEDQ представляет собой 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохиолин, ES-MS представляет собой электрораспылительную масс-спектрометрию, EtOAc представляет собой этилацетат, Fmoc представляет собой *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил), gly 15 представляет собой глицин, HATU представляет собой гексафторфосфат *O*-(7-азабензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуруния, HOBt представляет собой 1-гидроксibenзотриазол, ВЭЖХ представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию, ile представляет собой изолейцин, lys представляет собой лизин, MeCN (CH₃CN) представляет собой ацетонитрил, MeOH представляет собой метанол, Mtr 20 представляет собой 4-анизилдифенилметил (или 4-метокситритил), nor представляет собой (1*S*, 2*R*)-(+)-норэфедрин, PBS представляет собой фосфатно-солевой буфер (pH 7,4), PEG представляет собой полиэтиленгликоль, Ph представляет собой фенил, Pnp представляет собой *p*-нитрофенил, MC представляет собой 6-малеимидокапроил, phe представляет собой *L*-фенилаланин, PyBop представляет собой гексафторфосфат бром- 25 трис-пирролидинофосфония, SEC представляет собой эксклюзионную хроматографию, Su представляет собой сукцинимид, TFA представляет собой трифторуксусную кислоту, TLC представляет собой тонкослойную хроматографию, UV представляет собой ультрафиолет, и val представляет собой валин.

"Свободный остаток аминокислоты цистеина" относится к аминокислотному остатку 30 цистеина, который встроен в исходное антитело, имеет тиольную функциональную группу (-SH) и не является спаренным посредством внутримолекулярного или межмолекулярного дисульфидного мостика.

Термин "величина реакционной способности тиольной группы" представляет собой количественную характеристику реакционной способности свободных остатков 35 аминокислоты цистеина. Величина реакционной способности тиольной группы представляет собой процент свободных остатков аминокислоты цистеина в антителе со встроенными в него остатками цистеина, которые реагируют с реакционно-способным к тиольной группе реагентом, и преобразованную до максимальной величины, составляющей 1. Например, свободный остаток аминокислоты цистеина на антителе 40 со встроенными в него остатками цистеина, которая реагирует со 100% выходом с реакционно-способным к тиольной группе реагентом, таким как биотин-малеимидный реагент, с образованием меченного биотином антитела, имеет величину реакционной способности тиольной группы, составляющую 1,0. Другой остаток аминокислоты цистеина, встроенный в то же или другое исходное антитело, который реагирует с 45 реакционно-способным к тиольной группе реагентом с выходом 80%, имеет величину реакционной способности тиольной группы, составляющую 0,8. Другой остаток аминокислоты цистеина, встроенный в то же или другое исходное антитело, который совсем не реагирует с реакционно-способным к тиольной группе реагентом, имеет

величину реакционной способности тиольной группы, составляющую 0. Определение величины реакционной способности тиольной группы для конкретного остатка цистеина можно проводить анализом ELISA, масс-спектрометрией, жидкостной хроматографией, радиоавтографией или другими количественными аналитическими тестами.

- 5 "Исходное антитело" представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков заменяют одним или несколькими остатками цистеина. Исходное антитело может содержать нативную последовательность или последовательность дикого типа. Исходное антитело может иметь заранее существующие модификации аминокислотной последовательности
- 10 (такие как вставки, делеции и/или замены) относительно другой нативной формы, формы дикого типа или модифицированной формы антитела. Исходное антитело может быть направлено против представляющего интерес антигена-мишени, например, биологически значимого полипептида. Также предусматриваются антитела, направленные против неполипептидных антигенов (таких как ассоциированные с
- 15 опухолью гликолипидные антигены; см. US 5091178).

Таблица 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
20 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
25 /* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
30 /* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
35 /* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
40 /* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1        1      /* penalty per base */
#define PINS0        8      /* penalty for a gap */
#define PINS1        4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;      /* score at last jmp */
    long           offset;     /* offset of prev block */
    short          ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp      jp;        /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";  /* output file */

    nw();                 /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps();          /* get the actual jumps */
    print();              /* print stats, alignment */

    cleanup(0);           /* unlink any tmp files */
}

```


Таблица 1 (продолжение)

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
5  * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
10     char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
     int        *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
     int        ndelx, delx;       /* keep track of delx */
     int        *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
     int        mis;              /* score for each type */
     int        ins0, ins1;        /* insertion penalties */
     register   id;               /* diagonal index */
     register   ij;               /* jmp index */
     register   *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
15     register   xx, yy;          /* index into seqs */

     dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
     ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
     dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
     col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
     col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
20     ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
     ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
     smax = -10000;
     if (endgaps) {
         for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
             col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
             ndely[yy] = yy;
         }
         col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
25     }
     else
         for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
             dely[yy] = -ins0;

     /* fill in match matrix
     */
30     for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
         /* initialize first entry in col
         */
         if (endgaps) {
             if (xx == 1)
                 col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
             else
                 col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
35             ndelx = xx;
         }
         else {
             col1[0] = 0;
             delx = -ins0;
             ndelx = 0;
         }
     }
40
45

```

Таблица 1 (продолжение)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        col1[yy] = mis;

```

...nw

Таблица 1 (продолжение)

```

else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
5    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
10        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        coll[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
15    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
20                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
        }
        if (xx == len0 && yy < len1) {
25            /* last col
            */
            if (endgaps)
                coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
            if (coll[yy] > smax) {
                smax = coll[yy];
                dmax = id;
30        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
35    }

tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}

(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);

40    (void) free((char *)coll);
}

45

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
5  * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
10 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256 /* maximum output line */
#define P_SPC    3 /* space between name or num and seq */

15 extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
20     int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
25     olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
30     else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
35     else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

40

45

```

print

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
5 getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int      lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double     pct;
10    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
15    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
20        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
25            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
30    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
35    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
40
45

```

Таблица 1 (продолжение)

...getmat

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static nm; /* matches in core -- for checking */
static lmax; /* lengths of stripped file names */
static ij[2]; /* jmp index for a path */
static nc[2]; /* number at start of current line */
static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

pr_align

Таблица 1 (продолжение)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
5         * do we have more of this sequence?
        */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
10        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
15            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
            * are we at next gap for this seq?
            */
20            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                * we need to merge all gaps
                * at this location
                */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
25            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
30        nn = 0;
    }
}
/*
* dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
*/
35 static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
40
45

```

...pr_align

dumpblock

Таблица 1 (продолжение)

...dumpblock

```

5      (void) putc('\n', fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
          if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
              if (i == 0)
                  nums(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  stars();
              putline(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  fprintf(fx, star);
              if (i == 1)
                  nums(i);
          }
      }
  }
  /*
  * put out a number line: dumpblock()
  */
15  static
  nums(ix)
      int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
  {
      char      nline[P_LINE];
      register  i, j;
      register char *pn, *px, *py;
      for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
          *pn = ' ';
20      for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
          if (*py == ' ' || *py == '-')
              *pn = ' ';
          else {
              if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                  j = (i < 0)? -i : i;
                  for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                      *px = j%10 + '0';
25                  if (i < 0)
                      *px = '-';
              }
              else
                  *pn = ' ';
              i++;
          }
      }
30      *pn = '\0';
      nc[ix] = i;
      for (pn = nline; *pn; pn++)
          (void) putc(*pn, fx);
      (void) putc('\n', fx);
  }
35  /*
  * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
  */
  static
  putline(ix)
      int      ix;
      {
40
45

```

putline

Таблица 1 (продолжение)

...putline

```

5      int          i;
      register char *px;

      for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '.'; px++, i++)
          (void) putc(*px, fx);
      for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) putc(' ', fx);

      /* these count from 1:
      * ni[] is current element (from 1)
      * nc[] is number at start of current line
      */
10     for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) putc(*px&0x7F, fx);
      (void) putc('\n', fx);
    }

15     /*
      * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
      */
      static
      stars()
      {
20         int          i;
          register char *p0, *p1, cx, *px;

          if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
              !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
              return;
          px = star;
          for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
25             *px++ = ' ';

          for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
              if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                  if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                      cx = '*';
                      nm++;
30                  }
                  else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                      cx = '!';
                  else
                      cx = ' ';

                  }
              else
35                  cx = ' ';
              *px++ = cx;
          }
          *px++ = '\n';
          *px = '\0';
      }

```

stars

40

45

Таблица 1 (продолжение)

	<pre> /* * strip path or prefix from pn, return len: pr_align() */ static stripname(pn) char *pn; /* file name (may be path) */ { register char *px, *py; py = 0; for (px = pn; *px; px++) if (*px == '/') py = px + 1; if (py) (void) strcpy(pn, py); return(strlen(pn)); } </pre>	stripname
5		
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
5  * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;
10 int    cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                     cleanup
{
    int    i;
15     if (fj)
        (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
20 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                             getseq
{
    char    *file;    /* file name */
    int     *len;     /* seq len */
{
25     char    line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
30     tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
35     }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
40
45

```

Таблица 1 (продолжение)

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
5 while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
10 if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
15 dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}
char *
g_alloc(msg, nx, sz)
    char *msg; /* program, calling routine */
    int nx, sz; /* number and size of elements */
20 {
    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
25 return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
30 {
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
    if (tj) {
        (void) fclose(tj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
35 cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
40
45

```

g_alloc

readjmps

Таблица 1 (продолжение)

...readjumps

```

5         if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }

        else
            break;
    }

    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }

10    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1 */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }

    else
        break;
}

/* reverse the order of jumps */
30 for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}

for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}

35 if (fd >= 0)
    (void) close(fd);

if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}
}

```

40

45

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
5  writejumps(ix)                                writejumps
    int    ix;
    {
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
            if (mktemp(jname) < 0) {
10             fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
            if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                exit(1);
            }
        }
15     (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
    }
}

```

III. Композиции и способы по изобретению

20 Изобретение относится к антителам против CD79b или их функциональным фрагментам, и к способу их применения для лечения гемопозитических опухолей.

В одном аспекте изобретение относится к антителу, которое связывается, предпочтительно специфично, с любым из описанных выше или ниже полипептидов. Необязательно, антитело представляет собой моноклональное антитело, фрагмент

25 антитела, включая Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагмент, диателу, однодоменное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое конкурентно ингибирует связывание антитела против полипептида CD79b с соответствующим ему антигенным эпитопом. Антитела по настоящему изобретению необязательно могут быть конъюгированы с ингибирующим рост средством или

30 цитотоксическим средством, таким как токсин, включая, например, ауристатин, майтанзиноид, производное долостатина или калихеамицин, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или сходные с ними. Антитела по настоящему изобретению необязательно можно продуцировать в клетках СНО или бактериальных клетках, и предпочтительно они индуцируют гибель клетки, с которой они связываются.

35 Для целей детекции, антитела по настоящему изобретению можно метить поддающейся детекции меткой, связывать с твердой подложкой или сходные с ними.

В одном аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где одновалентная аффинность антитела к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента) является по существу такой же, как и

40 одновалентная аффинность антитела мыши (например, аффинность антитела мыши против CD79b в виде Fab-фрагмента) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента), содержащему последовательность варибельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14), состоящему

45 или по существу состоящему из них.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где одновалентная аффинность антитела к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента) является ниже, например, по меньшей

мере в 1, 2 или 3 раза ниже, чем одновалентная аффинность антитела мыши (например, аффинность антитела мыши против CD79b в виде Fab-фрагмента) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента), содержащему последовательность варибельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14), состоящему или по существу состоящему из них.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где одновалентная аффинность антитела к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента) превышает, например по меньшей мере в 1, 2 или 3 раз превышает, одновалентную аффинность антитела мыши (например, аффинность антитела мыши против CD79b в виде Fab-фрагмента) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента), содержащему последовательность варибельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14), состоящему или по существу состоящему из них.

В одном аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде фрагмента IgG) является по существу такой же, как и аффинность антитела мыши (например, аффинность антитела мыши против CD79b в виде фрагмента IgG) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела против CD79b в виде фрагмента IgG) в его двухвалентной форме, содержащему последовательность варибельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14), состоящему или по существу состоящему из них.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде фрагмента IgG) является ниже, например, по меньшей мере в 1, 2 или 3 раза ниже, чем аффинность антитела мыши (например, аффинность антитела мыши против CD79b в виде фрагмента IgG) или химерного антитела (например аффинность химерного антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента) в его двухвалентной форме, содержащему последовательность варибельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14), состоящему или по существу состоящему из них.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде фрагмента IgG) превышает, например, по меньшей мере в 1, 2 или 3 раза превышает, аффинность антитела мыши (например, аффинность антитела мыши против CD79b в виде фрагмента IgG) или химерного антитела (например аффинность химерного антитела против CD79b в виде Fab-фрагмента) в его двухвалентной форме, содержащему последовательность варибельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14), состоящему или по существу состоящему из них.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет 2,0 нМ. В следующем аспекте, изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность

антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет 2,0 нМ +/- 0,5.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет 1 нМ или выше. В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет 1,5 нМ или выше. В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет 2 нМ или выше. В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет 2,5 нМ или выше. В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет 3 нМ или выше. В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет между 1 нМ и 3 нМ. В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет между 1,5 нМ и 2,5 нМ. В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против CD79b, где аффинность антитела в его двухвалентной форме к CD79b (например, аффинность антитела против CD79b в виде IgG) составляет между 1,75 нМ и 2,25 нМ.

В одном аспекте одновалентная аффинность антитела мыши против CD79b является по существу такой же, как аффинность связывания Fab-фрагмента, содержащего последовательности варьируемых доменов SEQ ID NO:10 (фигура 7) и SEQ ID NO:14 (фигуры 8A-B). В другом аспекте одновалентная аффинность антитела мыши против CD79b является по существу такой же, как аффинность связывания Fab-фрагмента, содержащего последовательности варьируемых доменов антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС в качестве РТА-7712 11 июля 2006 года, или химерного антитела, содержащего варьируемые домены антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС в качестве РТА-7712 11 июля 2006 года.

Как установлено в данной области, аффинность связывания лиганда с его рецептором можно определять с использованием любого из множества анализов, и выражать с помощью различных количественных величин. Таким образом, в одном варианте осуществления, аффинность связывания выражают в качестве значений Kd и она отражает собственно аффинность связывания (например, с минимизированными эффектами avidности). Как правило, и предпочтительно, аффинность связывания измеряют *in vitro*, либо в бесклеточных условиях, либо в связанных с клетками условиях. Как описано более подробно в настоящем документе, кратность отличия аффинности связывания можно количественно определять в значениях отношения величины одновалентной аффинности связывания гуманизированного антитела (например, в Fab-форме) и величины одновалентной аффинности связывания эталонного/сравнительного антитела (например, в Fab-форме) (например, антитела мыши, имеющего донорные последовательности гипервариабельных областей), где величины аффинности

связывания определяют в сходных условиях анализа. Таким образом, в одном варианте осуществления, кратную разницу в аффинности связывания определяют как отношение значений K_d гуманизированного антитела в Fab-форме и указанного эталонного/сравнительного Fab-антитела. Например, в одном варианте осуществления, если антитело по изобретению (А) обладает аффинностью, которая в "3 раза ниже" аффинности эталонного антитела (М), тогда, если величина K_d для А составляет 3х, величина K_d для М составляет 1х, и отношение K_d А к K_d М составляет 3:1. Напротив, в одном варианте осуществления, если антитело по изобретению (С) обладает аффинностью, которая в "3 раза превышает" аффинность эталонного антитела (R), тогда, если величина K_d для С составляет 1х, величина K_d для R составляет 3х, и отношение K_d С к K_d R составляет 1:3. Для получения показателей аффинности связывания можно использовать любой из множества анализов, известных в данной области, включая анализы, описанные в настоящем документе, в том числе, например, *Biacore*, радиоиммунный анализ (RIA) и ELISA.

В одном аспекте предусматривается антитело, которое связывается с CD79b, где антитело содержит: (а) по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из группы, состоящей из:

(i) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A16 представляет собой KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:59)

(ii) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой LVSKLDS (SEQ ID NO:60)

(iii) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой WQGTNFPYT (SEQ ID NO:61)

(iv) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:62)

(v) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO:63) и

(vi) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F6, где F1-F10 представляет собой ARNLYL (SEQ ID NO:64).

В одном варианте осуществления, HVR-L1 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:59. В одном варианте осуществления, HVR-L2 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:60. В одном варианте осуществления, HVR-L3 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:61. В одном варианте осуществления, HVR-H1 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:62. В одном варианте осуществления, HVR-H2 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:63. В одном варианте осуществления, HVR-H3 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:64. В одном варианте осуществления, антитело по изобретению, содержащее эти последовательности (в сочетании, как описано в настоящем документе), представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека.

В одном аспекте предусматривается антитело, которое связывается с CD79b, где антитело содержит:

(а) по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из группы, состоящей из:

(i) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A16 представляет собой KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:59)

(ii) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой LVSKLDS (SEQ ID NO:60)

(iii) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой WQGTNFPYT (SEQ ID NO:61)

(iv) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:62)

5 (v) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18 где E1-E18 представляет собой GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO:63) и

(vi) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F6, где F1-F10 представляет собой ARNLYL (SEQ ID NO:64); и

(b) по меньшей мере один вариант HVR, где последовательность варианта HVR
10 содержит модификацию по меньшей мере одного остатка последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 или 64. В одном варианте осуществления, HVR-L1 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:59. В одном варианте осуществления, HVR-L2 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:60. В одном варианте осуществления, HVR-L3 антитела
15 по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:61. В одном варианте осуществления, HVR-H1 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:62. В одном варианте осуществления, HVR-H2 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:63. В одном варианте осуществления, HVR-H3 антитела по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO:64. В одном варианте
20 осуществления, антитело по изобретению, содержащее эти последовательности (в сочетании, как описано в настоящем документе), представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека.

В одном аспекте изобретение относится к антителу, содержащему одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, где каждая HVR содержит последовательность, выбранную
25 из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, состоит или по существу состоит из нее, и где SEQ ID NO:59 соответствует HVR-L1, SEQ ID NO:60 соответствует HVR-L2, SEQ ID NO:61 соответствует HVR-L3, SEQ ID NO:62 соответствует HVR-H1, SEQ ID NO:63 соответствует HVR-H2, и SEQ ID NO:64 соответствует HVR-H3. В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит HVR-L1, HVR-L2, HVR-
30 L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждая, в этом порядке, содержит SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64.

Варианты HVR в антителе по изобретению могут иметь модификации одного или нескольких остатков в HVR. В одном варианте осуществления, вариант HVR-L3 содержит 1-2 (1 или 2) замены в любом сочетании из следующих положений: C1 (F) и C8 (F). Буква
35 (ы) в скобках после каждого положения указывает на иллюстративную замену (т.е., замещение) аминокислоты; как будет понятно специалисту в данной области, пригодность других аминокислот в качестве аминокислот для замены в контексте, описанном в настоящем документе, можно оценивать с использованием обычных способов, известных в данной области и/или описанных в настоящем документе. В
40 одном варианте осуществления, C1 в варианте HVR-L3 представляет собой F. В одном варианте осуществления, C8 в варианте HVR-L3 представляет собой F. В одном варианте осуществления антитело по изобретению содержит вариант HVR-L3, где C1 представляет собой F и C8 представляет собой F.

В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит вариант HVR-
45 L3, где C1 представляет собой F. В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит вариант HVR-L3, где C8 представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления, указанное антитело с вариантом HVR-L3 далее содержит HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждая из них содержит, в этом

порядке, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, 60, 62, 63 и 64. В некоторых вариантах осуществления, эти антитела далее содержат консенсусную последовательность каркасной области тяжелой цепи подгруппы III человека. В одном варианте осуществления этих антител, консенсусная последовательность каркасной области содержит замену в положении 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах осуществления этих антител, положение 71 представляет собой А, положение 73 представляет собой Т и/или положение 78 представляет собой А. В одном из вариантов осуществления этих антител, эти антитела далее содержат консенсусную последовательность каркасной области легкой цепи κI человека.

В одном аспекте изобретение относится к антителу, содержащему последовательность HVR, представленную на фигуре 9 (SEQ ID NO:18).

Лекарственное средство для применения у индивида-хозяина предпочтительно вызывает небольшой иммунногенный ответ, или не вызывает его, против средства у указанного индивида. В одном варианте осуществления, изобретение относится к такому средству. Например, в одном варианте осуществления, изобретение относится к гуманизированному антителу, которое вызывает и/или как ожидается вызывает ответ антител человека против антител мыши (НАМА) по существу на сниженном уровне по сравнению с антителом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 10 и 14 у индивида-хозяина. В другом примере, изобретение относится к гуманизированному антителу, которое вызывает и/или предположительно вызывает минимальный ответ антител человека против антител мыши (НАМА), или не вызывает его. В одном примере, антитело по изобретению вызывает ответ против антител мыши, который находится на клинически-приемлемом уровне или ниже.

Гуманизированное антитело по изобретению может содержать одну или несколько последовательностей негипервариабельных областей (например, каркасных областей) человека или консенсусных последовательностей негипервариабельных областей человека в его вариабельном домене тяжелой или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, в последовательностях негипервариабельных областей (например, каркасных областей) человека или консенсусных последовательностях негипервариабельных областей человека присутствует одна или несколько дополнительных модификаций. В одном варианте осуществления, вариабельный домен тяжелой цепи антитела по изобретению содержит консенсусную последовательность каркасной области человека, которая в одном варианте осуществления представляет собой консенсусную последовательность каркасной области подгруппы III. В одном варианте осуществления антитело по изобретению содержит вариант консенсусной последовательности каркасной области подгруппы III, модифицированную по меньшей мере в одном аминокислотном положении. Например, в одном варианте осуществления, вариант консенсусной последовательности каркасной области подгруппы III может содержать замену в одном или нескольких из положений 71, 73 и/или 78. В одном варианте осуществления, указанная замена представляет собой R71A, N73T и/или L78A, в любом их сочетании.

Как известно в данной области, и как более подробно описано в настоящем документе ниже, аминокислотное положение/граница, определяющие гипервариабельную область антитела, могут варьировать, в зависимости от контекста и различных определений, известных в данной области (как описано ниже). Некоторые положения в вариабельном домене можно рассматривать как гибридные гипервариабельные положения в том отношении, что эти положения можно считать относящимися к гипервариабельной области при одном наборе критериев, и считать не относящимися к гипервариабельной

области при другом наборе критериев. Одно или несколько из этих положений также могут находиться в удлинённых гипервариабельных областях (как более подробно определено ниже). Изобретение относится к антителам, содержащим модификации в этих гибридных гипервариабельных положениях. В одном варианте осуществления, эти гипервариабельные положения включают одно или несколько из положений 26-30, 33-35В, 47-49, 57-65, 93, 94 и 101-102 в вариабельном домене тяжелой цепи. В одном варианте осуществления, эти гибридные гипервариабельные положения включают одно или несколько из положений 24-29, 35-36, 46-49, 56 и 97 в вариабельном домене легкой цепи. В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит вариант консенсусной последовательности каркасной области человека, модифицированный в одном или нескольких гибридных гипервариабельных положениях.

В одном аспекте антитело по изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий вариант консенсусной последовательности каркасной области подгруппы III человека, модифицированный в одном или нескольких из положений 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 и 101.

В одном аспекте антитело по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий вариант консенсусной последовательности каркасной области подгруппы I каппа человека, модифицированный в одном или нескольких из положений 24, 27-29, 56 и 97.

В одном аспекте антитело по изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий вариант консенсусной последовательности каркасной области подгруппы III, модифицированный в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или всех из положений 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 и 101. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело по изобретению содержит вариант консенсусной последовательности каркасной области подгруппы III, модифицированный в положении 71, 73 и/или 78. В одном варианте осуществления, указанная замена представляет собой R71A, N73T и/или L78A.

В одном аспекте антитело по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий вариант консенсусной последовательности каркасной области подгруппы I каппа человека, модифицированный в 1, 2, 3, 4, 5 или всех из положений 24, 27-29, 56 и 97.

Антитело по изобретению может содержать любые подходящие последовательности каркасной области легкой цепи человека или консенсусные последовательности каркасной области легкой цепи человека, при условии, что антитело обладает требуемыми биологическими характеристиками (например, требуемой аффинностью связывания). В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит по меньшей мере часть последовательности каркасной области легкой цепи К человека (или всю ее). В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит по меньшей мере часть консенсусной каркасной области К подгруппы I человека (или всю).

В одном аспекте антитело по изобретению содержит вариабельный домен тяжелой и/или легкой цепи, содержащий последовательность каркасной области, представленную в SEQ ID NO:9 (фигура 7) и/или 13 (фигуры 8А-В).

В одном аспекте антитело по изобретению представляет собой гуманизированное антитело против CD79b, конъюгированное с цитотоксическим средством. В одном аспекте гуманизированное антитело против CD79b, конъюгированное с цитотоксическим средством, ингибирует прогрессию опухоли в ксенотрансплантатах.

В одном аспекте как гуманизированное антитело, так и химерное антитело, являются

одновалентными. В одном варианте осуществления, как гуманизированное, так и химерное антитело, содержит одну Fab-область, связанную с Fc-областью. В одном варианте осуществления, эталонное химерное антитело содержит последовательности переменных доменов, представленные на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8А-В (SEQ ID NO:14), связанные с Fc-областью человека. В одном варианте осуществления, Fc-область человека представляет собой Fc-область IgG (например, IgG1, 2, 3 или 4).

В одном аспекте изобретение относится к антителу, содержащему переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:31-33). В одном варианте осуществления, переменный домен содержит последовательность F1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:27-30). В одном варианте осуществления, антитело содержит последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:34-35). В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 13, SEQ ID NO:31-33), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 13, SEQ ID NO:27-30). В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 13, SEQ ID NO:31-33), и последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:34-35). В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 13, SEQ ID NO:31-33), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 13, SEQ ID NO:27-30), и CH1 и/или Fc (фигура 13, SEQ ID NO:34-35).

В одном аспекте изобретение относится к антителу, содержащему переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:23-25). В одном варианте осуществления, переменный домен содержит последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:19-22). В одном варианте осуществления, антитело содержит последовательность CL1, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:26). В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO:23-25), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO:19-22), представленные на фигуре 13. В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO:23-25), и последовательность CL1 (SEQ ID NO:26), представленные на фигуре 13. В одном варианте осуществления, антитело по изобретению содержит переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO:23-26), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO:19-22), представленные на фигуре 13, и последовательность CL1, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:26).

В одном аспекте антитела по изобретению включают антитела со встроенными в них остатками цистеина, где одна или несколько аминокислот исходного антитела заменены свободным остатком аминокислоты цистеина, как описано в WO2006/034488; US 2007/0092940 (включенных в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме). Таким образом можно конструировать, т.е. подвергать мутации, любую форму антитела против CD79b. Например, исходный Fab-фрагмент антитела можно изменять

способами инженерии, чтобы он образовывал Fab со встроенными в него остатками цистеина, обозначаемый в настоящем документе как "тио-Fab". Аналогично, исходное моноклональное антитело можно изменять способами инженерии так, чтобы оно образовывало "тио-Mab". Следует отметить, что мутация в одном участке приводит к одному встроенному остатку цистеина в тио-Fab, в то время как в тио-Mab мутация в одном участке приводит к двум встроенным способам инженерии остаткам цистеина, вследствие димерной структуры антитела IgG. Антитела против CD79b со встроенными в них остатками цистеина по изобретению включают моноклональные антитела, гуманизированные или химерные моноклональные антитела, и антиген-связывающие фрагменты антител, слитые полипептиды и аналоги, которые предпочтительно связывают ассоциированные с клеткой полипептиды CD79b. Антитело со встроенными в него остатками цистеина альтернативно может включать антитело, содержащее цистеин в положении, описанном в настоящем документе, в антителе или Fab, благодаря конструированию последовательности и/или селекции антитела, без обязательного изменения исходного антитела, таких как конструирование и селекция антител с помощью фагового дисплея или конструирования *de novo* последовательностей каркасной области и константных областей легкой цепи и/или тяжелой цепи. Антитело со встроенными в него остатками цистеина содержит один или несколько свободных остатков аминокислоты цистеина, имеющих величину реакционной способности тиольной группы в диапазоне от 0,6 до 1,0; от 0,7 до 1,0 или от 0,8 до 1,0. Свободный остаток аминокислоты цистеина представляет собой остаток цистеина, который встроен способами инженерии в исходное антитело и не является частью дисульфидного мостика. Антитела со встроенными в них остатками цистеина пригодны для присоединения к ним цитотоксических и/или визуализирующих соединений в участке встроенного цистеина через, например, малеимид или галоацетил. Нуклеофильная реакционная способность тиольной функциональной группы остатка Cys в отношении малеимидной группы приблизительно в 1000 раз выше, чем у функциональной группы любой другой аминокислоты в белке, такой как аминокислота остатков лизина или N-концевая аминокислота. Специфичные к тиольной группе функциональные группы в йодоацетильных и малеимидных реагентах могут реагировать с аминокислотами, однако требуются более высокое значение pH (>9,0) и более длительное время реакции (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

В одном аспекте, антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина по изобретению содержит встроенный способом инженерии цистеин в любом из следующих положений, где положение пронумеровано согласно Кабат в легкой цепи (см. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) и согласно нумерации EU в тяжелой цепи (включая Fc-область) (см. Kabat et al. (1991), выше), где константный участок легкой цепи, указанный подчеркиванием на фигуре 17A и 18A, начинается в положении 109 (нумерация по Кабат), а константный участок тяжелой цепи, указанный подчеркиванием на фигурах 17B и 18B, начинается в положении 118 (нумерация EU). Также положение может быть обозначено по его положению в нумерации по последовательности для аминокислот полноразмерной легкой цепи и тяжелой цепи, представленных на фигурах 17-18. Согласно одному варианту осуществления изобретения, антитело против CD79b содержит встроенный в него цистеин в LC-V205C (номер по Кабат: Val 205; номер по последовательности 210 на фигуре 18A, измененный способами инженерии на Cys в этом положении). Встроенный цистеин в легкой цепи указан полужирным шрифтом с двойным подчеркиванием на фигуре 18A. Согласно

одному варианту осуществления, антитело против CD79b содержит встроенный цистеин в HC-A118C (номер EU: Ala 118; номер по Кабат 114; номер по последовательности 118 на фигуре 17B, измененный способами инженерии на Cys в этом положении). Встроенный цистеин в тяжелой цепи показан полужирным шрифтом с двойным подчеркиванием на фигуре 17B. Согласно одному из вариантов осуществления, антитело против CD79b содержит встроенный цистеин в Fc-S400C (номер EU: Ser 400; номер по Кабат 396; номер по последовательности 400 на фигуре 17-18B, измененный на Cys в этом положении). В других вариантах осуществления, встроенный цистеин тяжелой цепи (включая Fc-область) находится в любом из следующих положений (согласно нумерации по Кабат с нумерацией EU, указанной в скобках): 5, 23, 84, 112, 114 (118 при нумерации EU), 116 (120 при нумерации EU), 278 (282 при нумерации EU), 371 (375 при нумерации EU) или 396 (400 при нумерации EU). Таким образом, изменения аминокислот в этих положениях для исходного гуманизированного антитела против CD79b по изобретению представляют собой: V5C, A23C, A84C, S112C, A114C (A118C при нумерации EU), T116C (T120C при нумерации EU), V278C (V282C при нумерации EU), S371C (S375C при нумерации EU) или S396C (S400C при нумерации EU). Таким образом, изменения аминокислот в этих положениях для исходного химерного антитела против CD79b по изобретению представляют собой: Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (A118C при нумерации EU), T116C (T120C при нумерации EU), V278C (V282C при нумерации EU), S371C (S375C при нумерации EU) или S396C (S400C при нумерации EU). В других вариантах осуществления, встроенный цистеин легкой цепи находится в любом из следующих положений (согласно нумерации по Кабат): 15, 110, 114, 121, 127, 168, 205. Таким образом, изменения аминокислот в этих положениях для исходного гуманизированного антитела против CD79b по изобретению представляют собой: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C или V205C. Таким образом, изменения аминокислот в этих положениях для исходного химерного антитела против CD79b по изобретению представляют собой: I15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C или V205C.

В одном аспекте изобретение включает антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина, содержащее один или несколько свободных остатков аминокислоты цистеина, где антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина связывается с полипептидом CD79b и получено путем процесса, включающего замену одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела против CD79b на цистеин, где исходное антитело содержит по меньшей мере одну последовательность HVR, выбранную из:

(a) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A16 представляет собой KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:59)

(b) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой LVSKLDS (SEQ ID NO:60)

(c) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой WQGTHTFPYT (SEQ ID NO:61) или FQGTHTFPFT (SEQ ID NO:79)

(d) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:62)

(e) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO:63) и

(f) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F6, где F1-F10 представляет собой ARNLYL (SEQ ID NO:64).

В определенном аспекте, изобретение относится к антителу против CD79b со встроенными в него остатками цистеина, содержащему аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичность аминокислотной последовательности, альтернативно по меньшей мере приблизительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность аминокислотной последовательности с антителом со
 5 встроенными в него остатками цистеина, имеющим полноразмерную аминокислотную последовательность, как описано в настоящем документе, или антителом со встроенными в него остатками цистеина, имеющим аминокислотную последовательность лишенную сигнального пептида, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте, изобретение относится к выделенному антителу против CD79b со
 10 встроенными в него остатками цистеина, содержащему аминокислотную последовательность, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, которая гибридизуется с молекулой, комплементарной молекуле ДНК, кодирующей (а) антитело со встроенными в него остатками цистеина, имеющее полноразмерную аминокислотную последовательность, как описано в настоящем документе, (b) антитело со встроенными
 15 в него остатками цистеина, имеющее аминокислотную последовательность, лишенную сигнального пептида, как описано в настоящем документе, (c) внеклеточный домен трансмембранного белка антитела со встроенными в него остатками цистеина, с сигнальным пептидом или без него, как описано в настоящем документе, (d) аминокислотную последовательность, кодируемую любой из последовательностей
 20 нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе или (е) любой другой конкретно определенный фрагмент полноразмерной аминокислотной последовательности антитела со встроенными в него остатками цистеина, как описано в настоящем документе.

В конкретном аспекте, изобретение относится к выделенному антителу против CD79b со встроенными в него остатками цистеина без N-концевой сигнальной
 25 последовательности и/или без начального метионина, кодируемому нуклеотидной последовательностью, которая кодирует такую аминокислотную последовательность, как описано в настоящем документе. Способы его получения также описаны в настоящем документе, причем эти способы включают культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, который содержит соответствующую кодирующую молекулу
 30 нуклеиновой кислоты в условиях, подходящих для экспрессии антитела со встроенными в него остатками цистеина, и выделение антитела со встроенными в него остатками цистеина из клеточной культуры.

Другой аспект изобретения относится к выделенному антителу против CD79b со встроенными в него остатками цистеина, в котором трансмембранный домен либо
 35 удален, либо инактивирован. Способы его получения также описаны в настоящем документе, причем эти способы включают культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, который содержит соответствующую кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты в условиях, подходящих для экспрессии антитела со встроенными в него остатками цистеина, и выделение антитела со встроенными в него остатками цистеина
 40 из клеточной культуры.

В других аспектах, изобретение относится к выделенным химерным антителам против CD79b со встроенными в них остатками цистеина, включающим любое из описанных в настоящем документе антител со встроенными в него остатками цистеина, слитое с гетерологичным полипептидом (не CD79b). Примеры таких химерных молекул включают
 45 любое из описанных в настоящем документе антител со встроенными в них остатками цистеина, слитое с гетерологичным полипептидом, например, таким как последовательность эпитопной метки или Fc-область иммуноглобулина.

Антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина может

представлять собой моноклональное антитело, фрагмент антитела, химерное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое конкурентно ингибирует связывание антитела против полипептида CD79b с соответствующим ему антигенным эпитопом. Антитела по настоящему изобретению
 5 необязательно могут быть конъюгированы с ингибирующим рост средством или цитотоксическим средством, таким как токсин, включая, например, ауристин, майтанзиноид, производное долостатиона или калихеамицин, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или сходные с ними. Антитела по настоящему изобретению необязательно можно продуцировать в клетках СНО или бактериальных
 10 клетках и предпочтительно они ингибируют рост или пролиферацию клетки, с которой они связываются, или индуцируют ее гибель. Для диагностических целей, антитела по настоящему изобретению можно метить поддающейся детекции меткой, связанной с твердой подложкой, или сходными с ней.

В других аспектах настоящего изобретения, изобретение относится к векторам, содержащим ДНК, кодирующую любое из описанных в настоящем документе антител
 15 против CD79b и антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина. Также предусматриваются клетки-хозяева, содержащие любой такой вектор. В качестве примера, клетки-хозяева могут представлять собой клетки СНО, клетки *E. coli*, или клетки дрожжей. Также предусматривается процесс продукции любого из описанных
 20 в настоящем документе полипептидов, и он включает культивирование клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии требуемого полипептида, и выделение требуемого полипептида из клеточной культуры.

Антитела со встроенными в них остатками цистеина могут быть пригодны для лечения злокачественной опухоли и включают антитела, специфичные к рецепторам
 25 клеточной поверхности и трансмембранным рецепторам, и ассоциированным с опухолью антигенам (ТАА). Такие антитела можно использовать в виде простых антител (неконъюгированных с лекарственным средством или группой метки) или в виде конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Антитела со встроенными в них остатками цистеина по изобретению можно сайт-специфично и эффективно связывать
 30 с реакционно-способным к тиольной группе реагентом. Реакционно-способный к тиольной группе реагент может представлять собой многофункциональный линкерный реагент, реагент метки для улавливания, реагент флуорофора, или промежуточное соединение лекарственное средство-линкер. Антитело со встроенными в него остатками цистеина можно метить поддающейся детекции меткой, иммобилизовывать на
 35 твердофазной подложке и/или конъюгировать с группой лекарственного средства. Реакционная способность тиольной группы может быть общей для любого антитела, где можно проводить замену аминокислот реактивными аминокислотами цистеина в пределах легкой цепи, выбранных из диапазонов аминокислотных остатков: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210; и в пределах тяжелой
 40 цепи, выбранных из диапазонов аминокислотных остатков: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121, и в Fc-области в диапазонах, выбранных из H270-H280, H366-H376, H391-401, где нумерация аминокислотных положений начинается в 1 положении согласно системе нумерации Кабат (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,
 45 MD) и далее продолжается, как описано в WO2006034488; US 2007/0092940. Реакционная способность тиольной группы также может быть общей для определенных доменов антитела, таких как константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Замены цистеином, приводящие к величинам реакционной

способности тиольной группы, составляющим 0,6 и более, можно проводить в константных доменах тяжелой цепи α , δ , ϵ , γ и μ интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая подклассы IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Такие антитела и их применение описаны в WO2006/034488; US 2007/0092940.

5 Антитела со встроенными в них остатками цистеина по изобретению предпочтительно сохраняют антиген-связывающую способность их аналогов, представляющих исходное антитело дикого типа. Таким образом, антитела со встроенными в них остатками цистеина способны связываться, предпочтительно специфично, с антигенами. Такие антигены включают, например, ассоциированные с опухолью антигены (ТАА), белки
10 рецепторов клеточной поверхности и другие молекулы клеточной поверхности, трансмембранные белки, белки передачи сигнала, регуляторные факторы выживания клеток, регуляторные факторы клеточной пролиферации, молекулы, ассоциированные с развитием и дифференцировкой ткани (например, о которых известно или предполагают, что они участвуют в них функционально), лимфокины, цитокины,
15 молекулы, вовлеченные в регуляцию клеточного цикла, молекулы, вовлеченные в образование сосудов, и молекулы, ассоциированные с ангиогенезом (например, о которых известно или предполагают, что они участвуют в нем). Ассоциированный с опухолью антиген может представлять собой кластерный фактор дифференцировки (т.е., белок CD, включая, но не ограничиваясь ими CD79b). Антитела против CD79b со
20 встроенными в них остатками цистеина по изобретению сохраняют антиген-связывающую способность их аналогов, представляющих собой исходное антитело CD79b. Таким образом, антитела против CD79b со встроенными в них остатками цистеина по изобретению способны связываться, предпочтительно специфично, с антигенами CD79b, включая изоформы CD79b бета и/или альфа, в том числе, когда
25 такие антигены экспрессируются на поверхности клеток, включая, но не ограничиваясь ими, В-клетки.

В одном аспекте антитела по изобретению можно конъюгировать с любой группой метки, которая может быть ковалентно связана с антителом через реакционно-способную группу, активированную группу или реакционно-способную тиольную
30 группу цистеина (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304: 147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). Присоединенная метка может выполнять функции: (i) обеспечения поддающегося детекции сигнала; (ii) взаимодействия со второй меткой
35 для модификации поддающегося детекции сигнала, обеспечиваемого первой или второй меткой, например, для получения FRET (резонансного переноса энергии флуоресценции); (iii) стабилизации взаимодействий или повышения аффинности связывания с антигеном или лигандом; (iv) влияния на подвижность, например электрофоретическую подвижность или способность проникать в клетки, посредством заряда, гидрофобности,
40 формы или других физических параметров, или (v) обеспечения группы для улавливания, модулирования аффинности к лиганду, связывания антитело/антиген или образования комплексов с ионами.

Меченые антитела со встроенными в них остатками цистеина могут быть пригодны в диагностических анализах, например, для детекции экспрессии представляющего
45 интерес антигена в конкретных клетках, тканях или сыворотке. Для диагностических применений, антитело, как правило, метят поддающейся детекции группой. Доступно множество меток, которые, в общем, можно разделить на следующие категории:

Радиоизотопы (радионуклиды), такие как ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y ,

⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³³Xe, ¹⁷⁷Lu, ²¹¹At или ²¹³Bi. Меченые радиоизотопом антитела пригодны в экспериментах с нацеленной на рецепторы визуализацией. Антитело можно метить реагентами лигандов, которые связываются, образуют хелаты или иные комплексы с радиоизотопным металлом, где реагент является реакционно-способным к тиольной группе встроенного цистеина антитела, с использованием способов, описанных в *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Хелатирующие лиганды, которые могут образовывать комплекс с ионом металла, включают DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA и TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Радионуклиды можно нацеливать посредством образования комплексов с конъюгатами антитело-лекарственное средство по изобретению (Wu et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146).

Линкерные реагенты, такие как DOTA-малеимид (4-малеимидобутирамидобензил-DOTA), можно получать путем реакции аминокбензил-DOTA с 4-малеимидомасляной кислотой (Fluka), активированной изопропилхлорформиаом (Aldrich), с последующим способом Axworthy et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4): 1802-1807). DOTA-малеимидные реагенты реагируют со свободными остатками аминокислоты цистеина антител со встроенными в них остатками цистеина и обеспечивают образующий комплекс с металлом лиганд на антителе (Lewis et al. (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86). Хелатирующие линкерные реагенты для мечения, такие как DOTA-NHS (моно-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты), коммерчески доступны (Macrocyclics, Dallas, TX). Нацеленная на рецептор визуализация с помощью меченных радионуклидом антител может обеспечить маркер для каскада активации путем детекции и количественного определения постепенного накопления антител в опухолевой ткани (Albert et al. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 1207-1210). Конъюгированные радиоактивные металлы могут оставаться внутри клетки после лизосомальной деградации.

Комплексы хелат-металл, подходящие в качестве меток антител для экспериментов по визуализации, описаны в: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al. (1983) *J. Immunol. Methods* 65: 147-157; Meares et al. (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh et al. (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares et al. (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula et al. (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera et al. (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis et al. (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera et al. (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg et al. (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee et al. (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44: 1105-1112; Kobayashi et al. (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer et al. (2004) *J. Nucl. Med.* 45: 129-137; DeNardo et al. (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend et al. (2003) *Cancer Biotherapy & RadioPharmaceuticals* 18:355-363; Nikula et al. (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi et al. (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian et al. (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli et al. (1999) *Cancer Biotherapy & RadioPharmaceuticals*, 14:209-20.

Флуоресцентные метки включают метки, такие как хелаты редкоземельных элементов (хелаты европия), типы флуоресцеина, включая FITC, 5-карбоксифлуоресцеин, 6-карбоксифлуоресцеин; типы родамина, включая TAMRA; дансил; лиссамин; цианины; фикоэритрины; техасский красный; и их аналоги. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителами с использованием способов, описанных, например, в *Current Protocols in Immunology*, выше. Реагенты флуоресцентных красителей и

флуоресцентных меток включают реагенты, которые являются коммерчески доступными от Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) и Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

Различные фермент-субстратные метки являются доступными или описаны (US 4275149). Фермент, как правило, катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно измерить с использованием различных способов. Например, фермент может катализировать изменение цвета субстрата, которое можно измерить спектрофотометрически. Альтернативно фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Способы количественного определения изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат становится электронно-возбужденным при химической реакции и он может испускать свет, который можно измерить (с использованием, например, хемилюминометра) или он становится донором энергии акцептору флуоресценции. Примеры ферментных меток включают люциферазы (например, люциферазу светляка и бактериальную люциферазу; US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малатдегидрогеназу, мочевиназу, пероксидазу, такую как пероксидаза хрена (HRP), щелочную фосфатазу (AP), β -галактозидазу, глюкоамилазу, 15 лизоцим, оксидазы сахаридов (например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу), гетероциклические оксидазы (такие как уриказа и ксантинооксидаза), лактопероксидазу, микропероксидазу и т.п. Способы конъюгации ферментов с антителами описаны в O'Sullivan et al. (1981) "Methods for the Preparation of 20 Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

Примеры сочетаний фермент-субстрат включают, например:

(i) Пероксидаза хрена (HRP) с пероксидом водорода в качестве субстрата, где пероксид водорода окисляет предшественник красителя (например, ортофенилендиамин (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB));

(ii) щелочная фосфатаза (AP) с пара-нитрофенилфосфатом в качестве хромогенного субстрата; и

(iii) β -D-галактозидаза (β -D-Gal) с хромогенным субстратом (например, п-нитрофенил- β -D-галактозид) или флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидом.

30 Специалистам в данной области доступны другие многочисленные сочетания фермент-субстрат. Для общего обзора, см. US 4275149 и US 4318980.

Метку можно непрямо конъюгировать с боковой цепью аминокислоты, активированной боковой цепью аминокислоты, антителом со встроенными в него остатками цистеина и т.п. Например, антитело можно конъюгировать с биотином, а 35 любую из трех широких категорий меток, упомянутых выше, можно конъюгировать с авидином или стрептавидином, или наоборот. Биотин связывается селективно со стрептавидином и, таким образом, метка может быть конъюгирована с антителом таким непрямым образом. Альтернативно для достижения не прямой конъюгации метки с вариантом полипептида, вариант полипептида конъюгируют с небольшим гаптенем 40 (например, диоксином), и один из различных типов меток, упомянутых выше, конъюгируют с вариантом полипептида против гаптена (например, антителом против диоксиана). Таким образом, можно достигать не прямой конъюгации метки с вариантом полипептида (Hermanson, G. (1996), Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego).

Антитело по настоящему изобретению можно использовать в любом известном 45 способе анализа, таком как ELISA, конкурентные анализы связывания, прямые и не прямые сэндвич-анализы, и анализы иммунопреципитации (Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.).

Детектирующая метка может быть пригодна для локализации, визуализации и

количественного определения связывания или распознавания. Меченые антитела по изобретению могут осуществлять детекцию рецепторов клеточной поверхности. Другим применением меченных поддающейся детекции меткой антител является способ иммунного улавливания на гранулах, включающий конъюгацию гранул с флуоресцентно меченным антителом и детекцию флуоресцентного сигнала при связывании лиганда. В сходных способах детекции связывания используется эффект поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для измерения и детекции взаимодействий антитело-антиген.

Детектирующие метки, такие как флуоресцентные красители и хемилюминесцентные красители (Briggs et al. (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids", J. Chem. Soc, Perkin-Trans. 1:1051-1058) обеспечивают поддающийся детекции сигнал, и, как правило, применимы для мечения антител, предпочтительно со следующими свойствами: (i) меченное антитело должно продуцировать очень высокий сигнал при низком фоне, так чтобы можно было селективно выявить небольшие количества антител как в бесклеточных, так и в клеточных анализах; и (ii) меченное антитело должно быть фотостабильным, чтобы можно было наблюдать, подвергать мониторингу и регистрировать флуоресцентный сигнал без существенного обесцвечивания светом. Для применений, вовлекающих связывание на клеточной поверхности меченого антитела с мембранами или клеточными поверхностями, особенно живых клеток, метки предпочтительно (iii) обладают хорошей растворимостью в воде для достижения эффективной концентрации конъюгата и чувствительности детекции и (iv) являются нетоксичными для живых клеток, чтобы не нарушать нормальные метаболические процессы клеток или не вызывать преждевременную гибель клеток.

Прямое количественное определение интенсивности флуоресценции клеток и подсчет случаев флуоресцентного мечения, например, для связывания с клеточной поверхностью конъюгатов пептид-краситель, можно проводить на системе (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.), которая автоматизирует смешивание и считывание в нерадиоактивных анализах с живыми клетками или с гранулами (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204). Применения меченых антител также включают анализы связывания рецепторов клеточной поверхности, иммунные анализы улавливания, связанные с флуоресценцией иммуносорбентные анализы (FLISA), анализы расщепления каспазой (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 618-23; US 6372907), анализы апоптоза (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51) и анализы цитотоксичности. Технологию микрообъемного флуорометрического анализа можно использовать для идентификации положительной или отрицательной регуляции посредством молекулы, которая нацелена на клеточную поверхность (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51).

Меченые антитела по изобретению пригодны в качестве биомаркеров для визуализации и зондов в различных способах и технологиях биомедицинской и молекулярной визуализации, таких как: (i) MRI (магнитно-резонансная томография); (ii) MicroCT (компьютерная томография); (iii) СPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография); (iv) PET (позитронная эмиссионная томография), Chen et

al. (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) биоллюминесценция; (vi) флуоресценция; и (vii) ультразвуковое исследование. Иммуносцинтиграфия представляет собой способ визуализации, при котором антитела, меченные радиоактивными веществами, вводят животному или пациенту-человеку и делают снимок областей организма, в которых локализуется антитело (US 6528624). Биомаркеры для визуализации можно объективно измерять и использовать в качестве показателя нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство. Биомаркеры могут быть нескольких типов: биомаркеры типа 0 представляют собой естественные маркеры заболевания и они прямо коррелируют с известными клиническими показателями, например оценкой посредством MRI воспаления синовиальной оболочки при ревматоидном артрите; маркеры типа I дают информацию об эффекте вмешательства в соответствии с механизмом действия, даже хотя этот механизм может не быть ассоциированным с клиническим исходом; маркеры типа II функционируют в качестве заместителей конечных результатов, где изменение биомаркера или сигнал биомаркера предсказывает клиническую пользу для "подтверждения" направленного ответа, такие как измеренная посредством СТ эрозия кости при ревматоидном артрите. Маркеры для визуализации, таким образом, могут предоставить фармакодинамическую (PD) терапевтическую информацию о: (i) экспрессии белка-мишени, (ii) связывании лекарственного средства с белком-мишенью, т.е. селективности, и (iii) фармакокинетические данные о выведении и времени полужизни. Преимущества биомаркеров для визуализации *in vivo* относительно лабораторных маркеров включают: неинвазивное введение, поддающуюся количественному измерению оценку организма, повторяющиеся дозирование и оценку, т.е. оценку в несколько моментов времени, и потенциально переносимые эффекты от доклинических (небольшие животные) до клинических (человек) результаты. Для некоторых применений, биологическая визуализация заменяет или минимизирует ряд экспериментов на животных в доклинических исследованиях.

Способы мечення пептидов хорошо известны. См. Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al. (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin и New York; и Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al. (2004) *Chem.Eur. J.* 10: 1149-1155; Lewis et al. (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 110-115; Mier et al. (2005) *Bioconjugate Chem.* 16: 240-237.

Пептиды и белки, меченные двумя группами, флуоресцентным репортером и тушителем, расположенными достаточно близко, подвергаются резонансному переносу энергии флуоресценции (FRET). Репортерные группы, как правило, представляют собой флуоресцентные красители, которые возбуждаются под действием света при определенной длине волны и переносят энергию на группу акцептора, или тушителя, с соответствующим сдвигом Стокса для испускания при максимальной яркости. Флуоресцентные красители включают молекулы с крупными ароматическими группами, такими как флуоресцеин и родамин, и их производные. Флуоресцентный репортер

может частично или в значительной степени тушиться группой тушителя в интактном пептиде. При расщеплении пептида пептидазой или протеазой, можно измерять поддающееся детекции увеличение флуоресценции (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248: 18-34).

5 Меченые антитела по изобретению также можно использовать в качестве средства для аффинной очистки. В этом процессе, меченое антитело иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола Sephadex или фильтровальная бумага, с использованием способов, хорошо известных в данной области. Иммобилизованное антитело контактируют с образцом, содержащим антиген, подлежащий очистке, а затем подложку промывают
10 подходящим растворителем, который удаляет по существу весь материал в образце, за исключением антигена, подлежащего очистке, который связан с иммобилизованным вариантом полипептида. В конце, подложку промывают другим подходящим растворителем, таким как глициновый буфер, pH 5,0, который высвобождает антиген от варианта полипептида.

15 Реагенты для мечения, как правило, обладают реакционной функциональной группой, которая может реагировать (i) прямо с тиольной группой цистеина в антителе со встроенными в него остатками цистеина с образованием меченого антитела, (ii) с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения линкер-метка, или (iii) с линкерным антителом с образованием меченого антитела. Реактивные
20 функциональные группы реагентов для мечения включают: малеимид, галоацетил, сукцинимидильный сложный эфир йодацетамида (например, NHS, N-гидроксисукцинимид), изотиоцианат, сульфонилхлорид, 2,6-дихлортриазинил, пентафторфениловый сложный эфир и фосфорамидит, хотя также можно использовать другие функциональные группы.

25 Иллюстративная реактивная функциональная группа представляет собой N-гидроксисукцинимидильный сложный эфир (NHS) заместителя карбоксильной группы в поддающейся детекции метке, например, биотин или флуоресцентный краситель. Сложный эфир NHS и метки можно предварительно получать, выделять, очищать и/или охарактеризовывать, или его можно образовывать *in situ* и подвергать реакции с
30 нуклеофильной группой антитела. Как правило, карбоксильная форма метки активируется реакцией с некоторым сочетанием карбодиимидного реагента, например, дициклогексилкарбодиимидного, диизопропилкарбодиимидного или уранового реагента, например TSTU (O-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторбората, HBTU (O-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфата) или HATU
35 (O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфата), активатора, такого как 1-гидроксисукцинимид (HOBt), и N-гидроксисукцинимид с получением сложного эфира NHS и метки. В некоторых случаях, метку и антитело можно связывать посредством активации *in situ* метки и реакции с антителом с образованием конъюгата метка-антитело за одну стадию. Другие активирующие и связывающие реагенты
40 включают TBTU (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат), TFFH (N,N',N'',N'''-тетраметилурония 2-фторгексафторфосфат), PyBOP (бензотриазол-1-илокси-трис-пирролидинофосфония гексафторфосфат, EEDQ (2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохиолин), DCC (дициклогексилкарбодиимид); DIPCDI (диизопропилкарбодиимид), MSNT (1-(мезитилен-2-сульфонил)-3-нитро-1H-1,2,4-триазол,
45 и арилсульфонилгалогениды, например, триизопропилбензолсульфонилхлорид.

Соединения альбумин-связывающий пептид-Fab по изобретению:

В одном аспекте антитело по изобретению является слитым с альбумин-связывающим белком. Связывание с белком плазмы может быть эффективным способом улучшения

фармакокинетических свойств короткоживущих молекул. Альбумин представляет собой наиболее распространенный белок в плазме. Связывающие сывороточный альбумин пептиды (ABP) могут изменять фармакодинамику слитых с активным доменом белков, включая изменение захвата, проникновения и диффузии в ткани. Эти фармакодинамические параметры можно модулировать путем специального выбора соответствующих связывающих сывороточный альбумин пептидных последовательностей (US 20040001827). Ряд альбумин-связывающих пептидов был идентифицирован скринингом фагового дисплея (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Protrins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Соединения по изобретению включают последовательности ABP, описанные: (i) Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 в таблицах III и IV, стр. 35038; (ii) US 20040001827 в SEQ ID NO:9-22; и (iii) WO 01/45746 на страницах 12-13, все из которых включены в настоящий документ в качестве ссылок. Альбумин-связывающий пептид(ABP)-Fab конструируют слиянием альбумин-связывающего пептида с С-концом тяжелой цепи Fab в стехиометрическом соотношении 1:1 (1 ABP/1 Fab). Было показано, что связывание этих ABP-Fab с альбумином повышает время полужизни антитела более чем в 25 раз у кроликов и мышей. Таким образом, описанные выше реактивные остатки Cys можно встраивать в эти ABP-Fab и использовать для сайт-специфической конъюгации с цитотоксическими лекарственными средствами с последующими исследованиями на животных *in vivo*.

Иллюстративные последовательности альбумин-связывающих пептидов включают, но не ограничиваются ими, аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:80-84:

25	CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:80
	QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:81
	QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:82
	RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO:83
	DICLPRWGCLW	SEQ ID NO:84

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

В другом аспекте изобретение относится к иммуноконъюгатам, или конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибирующее рост средство, токсин (например, ферментативно активный токсин бактерий, грибов, растений или животных, или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е., радиоконъюгат). В другом аспекте изобретения, кроме того, предусматриваются способы применения иммуноконъюгатов. В одном аспекте иммуноконъюгат содержит любое из указанных выше антител против CD79b, ковалентно связанное с цитотоксическим средством или поддающимся детекции соединением.

В одном аспекте антитело против CD79b по изобретению связывается с тем же эпитопом CD79b, который связывается другим антителом против CD79b. В другом варианте осуществления, антитело против CD79b по изобретению связывается с тем же эпитопом на CD79b, который связывается Fab-фрагментом моноклонального антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС в качестве РТА-7712 11 июля 2006 года, моноклональным антителом, содержащим переменные домены SEQ ID NO:10 (фигура 7) и SEQ ID NO:14 (фигуры 8А-В) или химерным антителом, содержащим либо переменные домены антитела, полученного из гибридом РТА-7712, депонированных в АТСС 11 июля 2006 года, и константные домены из IgG1, либо

вариабельные домены моноклонального антитела, содержащие последовательности SEQ ID NO:10 (фигура 7) и SEQ ID NO:14 (фигуры 8A-B). В другом варианте осуществления, антитело против CD79b по изобретению связывается с тем же эпитопом на CD79b, который связывается другим антителом против CD79b (т.е., CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT 107-2 (AbD Serotec, каталожный #MCA2209), антителом против CD79b человека (BD Biosciences, каталожный #557592; San Jose, CA)).

В другом аспекте антитело против CD79b по изобретению связывается с эпитопом на CD79b, отличным от эпитопа, связываемого другим антителом против CD79b. В другом варианте осуществления, антитело против CD79b по изобретению связывается с эпитопом на CD79b, отличным от эпитопа, связываемого Fab-фрагментом моноклонального антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС в качестве РТА-7712 11 июля 2006 года, моноклонального антитела, содержащего вариабельные домены SEQ ID NO:10 (фигура 7) и SEQ ID NO:14 (фигуры 8A-B), или химерного антитела, содержащего либо вариабельные домены антитела, полученного из гибридом РТА-7712, депонированных в АТСС 11 июля 2006 года, и константные домены из IgG1, либо вариабельные домены моноклонального антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO:10 (фигура 7) и SEQ ID NO:14 (фигуры 8A-B). В другом варианте осуществления, антитело против CD79b по изобретению связывает эпитоп на CD79b, отличный от эпитопа на CD79b, связываемого другим антителом против CD79b (т.е., CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT 107-2 (AbD Serotec, каталожный #MCA2209), антителом против CD79b человека (BD Biosciences, каталожный #557592; San Jose, CA)).

В другом аспекте антитело против CD79b по изобретению отличается от (т.е., не является им) Fab-фрагмента моноклонального антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС в качестве РТА-7712 11 июля 2006 года, моноклонального антитела, содержащего вариабельные домены SEQ ID NO:10 (фигура 7) и SEQ ID NO:14 (фигуры 8A-B), или химерного антитела, содержащего либо вариабельные домены антитела, полученного из гибридом РТА-7712, депонированных в АТСС 11 июля 2006 года, и константные домены из IgG1, либо вариабельные домены моноклонального антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO:10 (фигура 7) и SEQ ID NO:14 (фигуры 8A-B). В другом варианте осуществления, антитело против CD79b по изобретению отличается от (т.е., не является им) Fab-фрагмента другого антитела против CD79b (т.е., CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec каталожный #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec, каталожный #MCA2209), антителом против CD79b человека (BD Biosciences, каталожный #557592; San Jose, CA)).

В одном аспекте антитело по изобретению специфично связывается с CD79b первого вида животных, и не связывается специфично с CD79b второго вида животных. В одном варианте осуществления, первым видом животных является человек и/или примат (например, яванская макака), а вторым видом животных является вид мышиных (например, мышь) и/или собачьих. В одном варианте осуществления, первым видом животных является человек. В одном варианте осуществления, первым видом животных является примат, например яванский макак. В одном варианте осуществления, вторым видом животного является вид мышиных, например мышь. В одном варианте осуществления, вторым видом животных является вид собачьих.

В одном аспекте изобретение относится к композициям, содержащим одно или несколько антител по изобретению и носитель. В одном варианте осуществления, носитель является фармацевтически приемлемым.

В одном аспекте изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитело против CD79b по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту по изобретению.

5 В одном аспекте изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению. Вектор может представлять собой вектор любого типа, например, рекомбинантный вектор, такой как экспрессирующий вектор. Можно использовать любые из множества клеток-хозяев. В одном варианте осуществления, клеткой-хозяином является прокариотическая клетка, например, *E.*
 10 *coli*. В одном варианте осуществления, клеткой-хозяином является эукариотическая клетка, например, клетка млекопитающих, такая как клетка яичника китайского хомяка (CHO).

В одном аспекте изобретение относится к способам получения антитела по изобретению. Например, изобретение относится к способу получения антитела против
 15 CD79b (которое, как определено в настоящем документе, включает полноразмерное антитело и его фрагменты), причем указанный способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора по изобретению, кодирующего указанное антитело (или его фрагмент), и выделение указанного антитела.

В одном аспекте изобретение относится к изделию, содержащему контейнер; и к
 20 композиции, содержащейся в контейнере, где композиция содержит одно или несколько антител против CD79b по изобретению. В одном варианте осуществления, композиция содержит нуклеиновую кислоту по изобретению. В одном варианте осуществления, композиция, содержащая антитело, дополнительно содержит носитель, который в некоторых вариантах осуществления является фармацевтически приемлемым. В одном
 25 варианте осуществления, изделие по изобретению дополнительно включает инструкции по введению композиции (например, антитела) индивиду.

В одном аспекте изобретение относится к набору, содержащему первый контейнер, содержащий композицию, содержащую одно или несколько CD79b антител по изобретению; и второй контейнер, содержащий буфер. В одном варианте осуществления,
 30 буфер является фармацевтически приемлемым. В одном варианте осуществления, композиция, содержащая антитело-антагонист дополнительно содержит носитель, который в некоторых вариантах осуществления является фармацевтически приемлемым. В одном варианте осуществления, набор дополнительно включает инструкции по введению композиции (например, антитела) индивиду.

35 В одном аспекте изобретение относится к применению антитела против CD79b по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение. В одном варианте осуществления, злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение выбраны
 40 из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

45 В одном аспекте изобретение относится к применению нуклеиновой кислоты по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение. В одном варианте осуществления,

злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение относится к применению экспрессирующего вектора по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение. В одном варианте осуществления, злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение относится к применению клетки-хозяина по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение. В одном варианте осуществления, злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение относится к применению изделия по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение. В одном варианте осуществления, злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение относится к применению набора по изобретению для изготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение. В одном варианте осуществления, злокачественная опухоль, опухоль и/или клеточно-пролиферативное нарушение выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста клетки, которая экспрессирует CD79b, причем указанный способ включает контактирование

указанной клетки с антителом по изобретению, тем самым вызывая ингибирование роста указанной клетки. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

5 В одном аспекте изобретение относится к способу медикаментозного лечения млекопитающего, имеющего злокачественную опухоль, содержащую клетку, которая экспрессирует CD79b, причем указанный способ включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела по изобретению, тем самым эффективно осуществляя лечение указанного млекопитающего. В одном
10 варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения или профилактики клеточно-пролиферативного нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией
15 CD79b, причем указанный способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела по изобретению, тем самым эффективно осуществляя лечение или профилактику указанного клеточно-пролиферативного нарушения. В одном варианте осуществления, указанное пролиферативное нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления,
20 антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста клетки, где рост указанной клетки по меньшей мере частично зависит от эффекта CD79b на усиление роста, причем указанный способ включает контактирование клетки с эффективным
25 количеством антитела по изобретению, тем самым ингибируя рост указанной клетки. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу медикаментозного лечения опухоли
30 у млекопитающего, где рост указанной опухоли по меньшей мере частично зависит от эффекта CD79b на усиление роста, причем указанный способ включает контактирование клетки с эффективным количеством антитела по изобретению, тем самым эффективно осуществляя лечение указанной опухоли. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления,
35 антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, включающему введение пациенту фармацевтического состава, содержащего иммуноконъюгат, описанный в настоящем документе, приемлемый разбавитель,
40 носитель или эксципиент. В одном варианте осуществления, злокачественная опухоль выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны. В одном варианте
45 осуществления, пациенту вводят цитотоксическое средство в сочетании с соединением конъюгата антитело-лекарственное средство.

В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования пролиферации В-клеток, включающему воздействие на клетку иммуноконъюгатом, содержащим антитело

по изобретению, в условиях, позволяющих связывание иммуноконъюгата с CD79b. В одном варианте осуществления, пролиферация В-клеток выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны. В одном варианте осуществления, В-клетка представляет собой ксенотрансплантат. В одном варианте осуществления, воздействие происходит *in vitro*. В одном варианте осуществления, воздействие происходит *in vivo*.

В одном аспекте изобретение относится к способу определения наличия CD79b в образце, предположительно содержащем CD79b, причем указанный способ включает воздействие на указанный образец антителом по изобретению, и определение связывания указанного антитела с CD79b в указанном образце, где связывание указанного антитела с CD79b в указанном образце указывает на наличие указанного белка в указанном образце. В одном варианте осуществления, образец представляет собой биологический образец. В следующем варианте осуществления, биологический образец содержит В-клетки. В одном варианте осуществления, биологический образец представляет собой образец от млекопитающего, страдающего или предположительно страдающего В-клеточным нарушением и/или В-клеточно-пролиферативным нарушением, включая, но не ограничиваясь ими, лимфому, неходжкинскую лимфому (NHL), агрессивную NHL, рецидивирующую агрессивную NHL, рецидивирующую вялотекущую NHL, рефрактерную NHL, рефрактерную вялотекущую NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарную лимфому, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфому из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение относится к способу диагностики клеточно-пролиферативного нарушения, ассоциированного с увеличением количества клеток, таких как В-клетки, экспрессирующие CD79b, причем способ включает конактирование тестируемых клеток в биологическом образце с любым из указанных выше антител; определение уровня антител, связавшихся с тестируемыми клетками в образце, посредством детекции связывания антитела с CD79b; и сравнение с уровнем антитела, связавшегося с клетками в контрольном образце, где уровень связавшегося антитела нормализуют относительно количества клеток, экспрессирующих CD79b, в тестируемом и контрольном образцах, и где более высокий уровень связавшегося антитела в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом указывает на наличие клеточно-пролиферативного нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD79b.

В одном аспекте изобретение относится к способу детекции растворимого CD79b в крови или сыворотке, причем способ включает контактирование тестируемого образца крови или сыворотки от млекопитающего, предположительно страдающего В-клеточно-пролиферативным нарушением, с антителом против CD79b по изобретению и детекцию повышения содержания растворимого CD79b в тестируемом образце относительно контрольного образца крови или сыворотки от здорового млекопитающего. В одном варианте осуществления, способ детекции пригоден в качестве способа диагностики В-клеточно-пролиферативного нарушения, ассоциированного с увеличением содержания растворимого CD79b в крови или сыворотке млекопитающего.

В одном аспекте изобретение относится к способу связывания антитела по изобретению с клеткой, которая экспрессирует CD79b, причем указанный способ включает контактирование указанной клетки с антителом по изобретению. В одном

варианте осуществления, антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном варианте осуществления, антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

Способы по изобретению можно применять для влияния на любое подходящее патологическое состояние, например, на клетки и/или ткани, ассоциированные с экспрессией CD79b. В одном варианте осуществления, клетки, на которые направлен способ по изобретению, представляют собой гемопоэтические клетки. Например, гемопоэтическая клетка может представлять собой клетку, выбранную из группы, состоящей из лимфоцита, лейкоцита, тромбоцита, эритроцита и естественной киллерной клетки. В одном варианте осуществления, клетка, на которую направлен способ по изобретению, представляет собой В-клетку или Т-клетку. В одном варианте осуществления, клетка, на которую направлен способ по изобретению, представляет собой злокачественную клетку. Например, злокачественная клетка может представлять собой клетку, выбранную из группы, состоящей из клетки лимфомы, клетки лейкоза или клетки миеломы.

Способы по изобретению, кроме того, могут включать дополнительные стадии лечения. Например, в одном варианте осуществления, способ дополнительно включает стадию, где клетку-мишень и/или ткань-мишень (например, злокачественную клетку) подвергают радиационному облучению или воздействию химиотерапевтического средства.

Как описано в настоящем документе, CD79b представляет собой компонент передачи сигнала В-клеточного рецептора. Таким образом, в одном варианте осуществления способов по изобретению, клетка, на которую осуществляется нацеливание (например, злокачественная клетка) представляет собой клетку, в которой экспрессируется CD79b, по сравнению с клеткой, которая не экспрессирует CD79b. В следующем варианте осуществления, клетка-мишень представляет собой злокачественную клетку, в которой экспрессия CD79b усилена по сравнению с нормальной незлокачественной клеткой ткани того же типа. В одном варианте осуществления, способ по изобретению вызывает гибель клетки-мишени.

В других аспектах настоящего изобретения, изобретение относится к векторам, содержащим ДНК, кодирующую любое из антител, описанных в настоящем документе. Также предусматривается клетка-хозяин, содержащая любой такой вектор. В качестве примера, клетки-хозяева могут представлять собой клетки CHO, клетки *E. coli* или клетки дрожжей. Кроме того, предусматривается процесс продукции антител, описанных в настоящем документе, и он включает культивирование клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии требуемого антитела и выделения требуемого антитела из клеточной культуры.

В другом аспекте изобретения относится к композиции, содержащей антитело против CD79b, как описано в настоящем документе, в сочетании с носителем. Необязательно, носителем является фармацевтически приемлемый носитель.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению антитела против полипептида CD79b, как описано в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства, подходящего для лечения состояния, которое отвечает на антитело против полипептида CD79b.

Другой аспект изобретения относится к композиции, содержащей смесь соединений антитело-лекарственное средство формулы I, где средняя нагрузка лекарственным средством на антитело составляет от приблизительно 2 до приблизительно 5, или от приблизительно 3 до приблизительно 4.

Другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей соединение ADC формулы I, смесь соединений ADC формулы I, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент.

5 Другой аспект относится к фармацевтическому сочетанию, включающему соединение ADC формулы I и второе соединение, обладающее свойствами, направленными против злокачественной опухоли, или другими терапевтическими эффектами.

Другой аспект относится к способу уничтожения или ингибирования пролиферации опухолевых клеток или злокачественных клеток, включающий обработку клеток таким количеством конъюгата антитело-лекарственное средство формулы I, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, которое является эффективным для уничтожения или ингибирования пролиферации опухолевых клеток или злокачественных клеток.

Другой аспект относится к способу лечения злокачественной опухоли, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей ADC формулы I.

Другой аспект относится к изделиям, т.е. к наборам, содержащим конъюгат антитело-лекарственное средство, контейнер и вкладыш в упаковку или ярлык, с указаниями по введению.

Один аспект изобретения относится к способу получения соединения конъюгата антитело-лекарственное средство формулы I, включающему стадии: (a) проведения реакции группы встроенного цистеина антитела со встроенными в него остатками цистеина с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения антитело-линкер Ab-L; и (b) проведения реакции Ab-L с активированной группой лекарственного средства D; тем самым получая конъюгат антитело-лекарственное средство; или включающему стадии: (c) проведения реакции нуклеофильной группы в группе лекарственного средства с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения лекарственное средство-линкер D-L; и (d) проведения реакции D-L с группой встроенного цистеина в антителе со встроенными в него остатками цистеина; тем самым получая конъюгат антитело-лекарственное средство.

Один аспект изобретения относится к анализу для детекции злокачественных клеток, включающему: (a) воздействие на клетки конъюгата антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства; и (b) определение степени связывания соединения конъюгата антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства с клетками.

A. Антитела против CD79b

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к антителам против CD79b, которые можно использовать в настоящем документе в качестве лекарственных средств. Иллюстративные антитела включают поликлональные, моноклональные, гуманизированные, биспецифические антитела и гетероконъюгаты антител.

1. Поликлональные антитела

Поликлональные антитела предпочтительно индуцируют у животных многократными подкожными (sc) или внутривенными (ip) инъекциями соответствующего антигена и адъюванта. Может быть подходящей конъюгация соответствующего антигена (особенно когда используют синтетические пептиды) с белком, который является иммуногенным у видов, подлежащих иммунизации. Например, антиген можно конъюгировать с гемоцианином лимфы улитки (KLH), сывороточным альбумином,

бычим тиреоглобулином, или ингибитором трипсина сои, с использованием бифункционального или образующего производное агента, например, сложного эфира малеимидобензолсульфосукцинимид (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 , или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 являются отличающимися алкильными группами.

Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных комбинированием, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и инъекцией раствора внутривенно в несколько областей. Через один месяц животным проводят повторную иммунизацию от 1/5 до 1/10 от исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда посредством подкожной инъекции в несколько областей. Через от семи до 14 суток, у животных проводят забор крови и сыворотку анализируют в отношении титра антител. Животным проводят повторные иммунизации до достижения титрами плато. Конъюгаты также можно получать в рекомбинантной клеточной культуре в качестве белковых слитых молекул. Также, для усиления иммунного ответа подходящим образом используют вызывающие агрегацию средства, такие как квасцы.

2. Моноклональные Антитела

Моноклональные антитела можно получать с использованием способа гибридом, впервые описанного Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или их можно получать способами рекомбинантных ДНК (патент США No. 4816567).

В способе гибридом, мышь или другого подходящего животного-хозяина, такого как хомяк, иммунизируют, как описано выше, для получения лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфично связываются с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют, а затем подвергают слиянию с миеломной клеточной линией с использованием подходящего средства, вызывающего слияние клеток, такого как полиэтиленгликоль, с получением гибридомных клеток (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы (также называемых партнерами по слиянию). Например, если исходные клетки миеломы лишены фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазы (HGPRT или HPRT), селективная культуральная среда для гибридом, как правило, включает вещества гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые препятствуют росту клеток, дефицитных по HGPRT.

Предпочтительные миеломные клетки-партнеры представляют собой клетки, которые эффективно подвергаются слиянию, которые поддерживают стабильно высокий уровень продукции антител отобранными антителопродуцирующими клетками и являются чувствительными к селективной среде, которая осуществляет селекцию против неслитых исходных клеток. Предпочтительными миеломными клеточными линиями являются линии миеломы мышей, такие как линии, полученные из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, доступные в Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и клетки SP-2 и производные, например, X63-Ag8-653, доступные в American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. Также для продукции моноклональных антител человека описаны миеломные клеточные линии человека и линии гетеромиеломы мыши-

человека (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); и Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают гибридомные клетки, оценивают на продукцию моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно, специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками, определяют посредством иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела можно определять, например, посредством анализа Скэтчарда, описанного в Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать способами лимитирующих разведений и выращивать стандартными способами (Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие для этой цели культуральные среды включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки можно выращивать *in vivo* у животных в качестве асцитных опухолей, например, посредством инъекции клеток мышам.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, подходящим способом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки общепринятыми способами очистки антител, например, такими как аффинная хроматография (например, хроматография с использованием системы белок А- или белок G-сефароза) или ионообменная хроматография, хроматография с гидроксиллапатитом, гель-электрофорез, диализ и т. д.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Гибридомные клетки служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. Для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах, после выделения ДНК можно встраивать в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в ином случае не продуцируют белок антитела. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

В следующем варианте осуществления, моноклональные антитела или фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, созданных с использованием способов, описанных в McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). В Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) описано выделение антител мыши и человека, соответственно, с использованием фаговых библиотек. В более поздних публикациях описана продукция высокоаффинных (нМ-порядок) антител человека посредством перестановки цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекции и рекомбинации *in vivo* в качестве стратегии для конструирования очень крупных фаговых библиотек (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти способы представляют собой приемлемые альтернативы традиционным способам гибридомных моноклональных антител для

выделения моноклональных антител.

Также ДНК, которая кодирует антитело, можно модифицировать для получения химерных или слитых полипептидов антител, например, посредством замены последовательностями константного домена тяжелой и легкой цепи (C_H и C_L) человека гомологичными последовательностями мыши (патент США No. 4816567; и Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci USA, 81:6851 (1984)), или слияния кодирующей иммуноглобулин последовательности со всей кодирующей последовательностью для полипептида, не являющегося иммуноглобулином, или ее частью (гетерологичный полипептид). Последовательностями полипептидов, не являющихся иммуноглобулинами, заменяют константные домены антитела, или ими заменяют переменные домены одного антиген-связывающего центра антитела с получением химерного двухвалентного антитела, содержащего один антиген-связывающий центр со специфичностью к одному антигену и другой антиген-связывающий центр со специфичностью к другому антигену.

3. Антитела человека и гуманизированные антитела

Антитела против CD79b, кроме того, могут включать гуманизированные антитела или антитела человека. "Гуманизированные" формы антител не человека (например, мыши) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антиген-связывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, образованную из иммуноглобулина не человека. Гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками CDR не относящегося к человеку вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющими требуемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях, остатки каркасной области Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками не человека. Гуманизированные антитела также могут содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в импортных последовательностях CDR или каркасной области. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного, и как правило, двух, переменных доменов, в которых все или по существу все из областей CDR соответствуют CDR иммуноглобулина не человека, и все или по существу все из областей FR представляют собой области FR консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также в оптимальном случае будет содержать по меньшей мере часть константного участка (Fc) иммуноглобулина, как правило, константного участка иммуноглобулина человека [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)].

Способы гуманизации антител, не являющихся человеческими, описаны в данной области. Как правило, гуманизированное антитело обладает одним или несколькими встроенными в него аминокислотными остатками из источника, который не является человеческим. Такие не являющиеся человеческими аминокислотные остатки часто называют "импортными" остатками, которые, как правило, взяты из "импортной" переменной области. Гуманизацию, главным образом, можно проводить в соответствии со способом Winter и коллег [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)], посредством замены CDR или последовательностями CDR крысы соответствующих последовательностей антитела человека. Таким образом, такие "гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела (патент США No. 4816567), где по

существованию менее целой вариабельной области человека замещено соответствующей последовательностью вида, не относящегося к человеку. На практике, гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Выбор вариабельных доменов человека, как легких, так и тяжелых цепей, для использования при получении гуманизированных антител является очень важным для снижения антигенности и ответа НАМА (антитела человека против антител мыши), когда антитело предназначено для терапевтического применения у человека. Снижение или устранение ответа НАМА является существенным аспектом клинической разработки подходящих лекарственных средств. См., например, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135: 1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147: 1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Как описано в настоящем документе, изобретение относится к антителам, которые являются гуманизированными, так чтобы ответ НАМА снижался или устранялся. Варианты этих антител, кроме того, можно получать с использованием общепринятых способов, известных в данной области, некоторые из которых дополнительно описаны ниже. Согласно так называемому способу "наилучшего соответствия", последовательность вариабельного домена антитела грызуна анализируют относительно целой библиотеки известных последовательностей вариабельных доменов человека. Идентифицируют последовательность V-домена человека, которая является наиболее сходной с последовательностью грызуна, и каркасную область (FR) человека в ней принимают для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol, 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). В другом способе используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех антител человека из конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одну и ту же каркасную область можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Например, аминокислотная последовательность из антитела, как описано в настоящем документе, может служить в качестве начальной (исходной) последовательности для обеспечения разнообразия последовательности(ей) каркасной области и/или гипервариабельной последовательности(ей). Выбранную последовательность каркасной области, с которой связывают исходную гипервариабельную последовательность, называют в настоящем документе акцепторной каркасной областью человека. Хотя акцепторные каркасные области могут быть из, или могут быть образованы из, иммуноглобулина человека (его VL- и/или VH-областей), предпочтительно акцепторные каркасные области взяты, или образованы, из консенсусной последовательности каркасной области человека, такой как каркасные области, которые, как показано, обладают минимальной иммуногенностью у пациентов-людей, или не обладают ей.

Когда акцептор образован из иммуноглобулина человека, необязательно можно выбирать последовательность каркасной области человека, которая отобрана на основе ее гомологии с донорной последовательностью каркасной области путем выравнивания донорной последовательности каркасной области с различными последовательностями каркасной области человека в коллекции последовательностей каркасных областей человека, и наиболее гомологичную последовательность каркасной области можно

выбирать в качестве акцептора.

В одном варианте осуществления, консенсусная каркасная область человека, описанная в настоящем документе, взята, или образована, из консенсусных последовательностей каркасной области VH подгруппы III и/или VL каппа подгруппы I.

Таким образом, акцепторная каркасная область VH человека может содержать одну, две, три или все из следующих последовательностей каркасных областей:

FR1, содержащая EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:69),

FR2, содержащая WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:70),

FR3, содержащая RFTISX₁DX₂SKNTX₃YLMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:73), где X₁ представляет собой A или R, X₂ представляет собой T или N, и X₃ представляет собой A или L,

FR4, содержащая WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:72).

Примеры консенсусных каркасных областей VH включают:

консенсусную каркасную область VH подгруппы I человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:36);

консенсусную каркасную область VH подгруппы I человека без удлинённых гипервариабельных областей (SEQ ID NO:37-39);

консенсусную каркасную область VH подгруппы II человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:40);

консенсусную каркасную область VH подгруппы II человека без удлинённых гипервариабельных областей (SEQ ID NO:41-43);

консенсусную каркасную область VH подгруппы III человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:44);

консенсусную каркасную область VH подгруппы III человека без удлинённых гипервариабельных областей (SEQ ID NO:45-47);

акцепторную каркасную область VH человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:48);

акцепторную каркасную область VH человека без удлинённых гипервариабельных областей (SEQ ID NO:49-50);

акцепторную каркасную область 2 VH человека без CDR по Кабат (SEQ ID NO:51); или

акцепторную каркасную область 2 VH человека без удлинённых гипервариабельных областей (SEQ ID NO:52-54).

В одном варианте осуществления, акцепторная каркасная область VH человека содержит одну, две, три или все из следующих последовательностей каркасных областей:

FR1, содержащая EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:69),

FR2, содержащая WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:70),

FR3, содержащая RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:71),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:74),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:75),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO:76), или

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO:77)

FR4, содержащая WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:72).

Акцепторная каркасная область VL человека может содержать одну, две, три или все из следующих последовательностей каркасных областей:

FR1, содержащая DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:65),

FR2, содержащая WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66),

FR3, содержащая GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67),

FR4, содержащая FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:68).

Примеры консенсусных каркасных областей VL включают:

консенсусную каркасную область VL каппа подгруппы I человека (SEQ ID NO:55);

консенсусную каркасную область VL каппа подгруппы II человека (SEQ ID NO:56);

5 консенсусную каркасную область VL каппа подгруппы III человека (SEQ ID NO:57);
или

консенсусную каркасную область VL каппа подгруппы IV человека (SEQ ID NO:58)

Хотя последовательность акцептора может быть идентична выбранной последовательности каркасной области человека, независимо от того, взята ли она из
10 иммуноглобулина человека или из консенсусной каркасной области человека, настоящее изобретение предусматривает, что акцепторная последовательность может содержать ранее существующие аминокислотные замены относительно последовательности иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области человека. Эти ранее существующие замены предпочтительно являются минимальными,
15 как правило, составляя только четыре, три, два или одно отличия в аминокислотах относительно последовательности иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области.

Остатки гипервариабельной области антитела, не являющегося антителом человека, включают в акцепторные каркасные области VL и/или VH человека. Например, можно
20 включать остатки, соответствующие остаткам CDR по Кабат, остаткам гипервариабельных петель по Chothia, остаткам Abm и/или контактными остаткам.

Необязательно, включают следующие остатки удлиненной гипервариабельной области: 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3), 26-35В (H1), 50-65, 47-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3).

25 Хотя "включение" остатков гипервариабельной области рассмотрено в настоящем документе, будет понятно, что его можно обеспечивать различными способами, например, нуклеиновую кислоту, кодирующую требуемую аминокислотную последовательность, можно получать мутацией нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность вариабельного домена мыши, так чтобы его остатки каркасной
30 области заменялись остатками акцепторной каркасной области человека, или мутацией нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность вариабельного домена человека, так чтобы остатки гипервариабельного домена заменялись остатками, не являющимися человеческими, или синтезом нуклеиновой кислоты, кодирующей требуемую последовательность, и т.д.

35 В примерах настоящего описания, получали варианты с пересаженной гипервариабельной областью путем мутагенеза способом Kunkel нуклеиновой кислоты, кодирующей акцепторные последовательности человека, с использованием отдельного олигонуклеотида для каждой гипервариабельной области. Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987). Соответствующие изменения можно вносить в каркасную область
40 и/или гипервариабельную область с использованием общепринятых способов, для коррекции и восстановления надлежащих взаимодействий гипервариабельная область-антиген.

Фаговый (фагмидный) дисплей (также называемый в настоящем документе фаговым дисплеем в некоторых контекстах) можно использовать в качестве удобного и быстрого
45 способа получения и скрининга множества различных потенциальных вариантов антител в библиотеке, полученной рандомизацией последовательности. Однако специалисту доступны и другие способы получения и скрининга измененных антител.

Технология фагового (фагмидного) дисплея обеспечивает мощный инструмент для

получения и селекции новых белков, которые связываются с лигандом, таким как антиген. Использование способов фагового (фагмидного) дисплея позволяет получить большие библиотеки вариантов белков, которые можно быстро сортировать по тем последовательностям, которые связываются с молекулой-мишенью с высокой аффинностью. Нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты полипептидов, как правило, подвергают слиянию с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок вирусной оболочки, такой как белок гена III или белок гена VIII. Были разработаны одновалентные системы фагмидного дисплея, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или полипептид, подвергают слиянию с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей часть белка гена III. (Bass, S., Proteins, 8:309 (1990); Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3:205 (1991)). В одновалентной системе фагмидного дисплея, слитый ген экспрессируется на низких уровнях и также экспрессируются белки гена III дикого типа, так что инфекционность частиц сохраняется. Способы создания пептидных библиотек и скрининга этих библиотек описаны во многих патентах (например, патент США No. 5723286, патент США No. 5432018, патент США No. 5580717, патент США No. 5427908 и патент США No. 5498530).

Библиотеки антител или антиген-связывающих полипептидов получают различными способами, включая изменение отдельного гена встраиванием случайных последовательностей ДНК или клонированием семейства сходных генов. Способы дисплея антител или антиген-связывающих фрагментов с использованием фагового (фагмидного) дисплея описаны в патентах США No. 5750373, 5733743, 5837242, 5969108, 6172197, 5580717 и 5658727. Затем библиотеку подвергают скринингу на экспрессию антител или антиген-связывающих белков с требуемыми характеристиками.

Способы замены выбранных аминокислот в матричной нуклеиновой кислоте хорошо известны в данной области, и некоторые из них описаны в настоящем документе. Например, остатки гипервариабельной области можно заменять с использованием способа Kunkel. См., например, Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987).

Последовательность олигонуклеотидов включает один или несколько из сконструированных наборов кодонов для остатков гипервариабельной области, подлежащих изменению. Набор кодонов представляет собой набор различных нуклеотидных триплетных последовательностей, используемых для кодирования требуемых вариантов аминокислот. Наборы кодонов могут быть представлены с использованием символов для обозначения конкретных нуклеотидов или эквимоллярных смесей нуклеотидов, как представлено ниже, согласно коду IUB.

КОДЫ IUB

G Гуанин

A Аденин

T Тимин

C Цитозин

R (A или G)

Y (C или T)

M (A или C)

K (G или T)

S (C или G)

W (A или T)

H (A или C или T)

V (C или G или T)

V (A или C или G)

D (A или G или T) H

N (A или C или G или T)

Например, в наборе кодонов DVK, D может представлять собой нуклеотиды A или G или T; V может представлять собой A или G или C; и K может представлять собой G или T. Этот набор кодонов может соответствовать 18 различным кодоном и может кодировать аминокислоты: Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys.

Наборы олигонуклеотидов или праймеров можно синтезировать с использованием стандартных способов. Можно синтезировать набор олигонуклеотидов, например, с помощью твердофазного синтеза, содержащий последовательности, которые соответствуют всем возможным сочетаниям нуклеотидных триплетов, обеспечиваемых набором кодонов и которые кодируют требуемую группу аминокислот. Синтез олигонуклеотидов с определенной "вырожденностью" нуклеотидов в определенных положениях хорошо известен в данной области. Такие наборы нуклеотидов, имеющих определенные наборы кодонов, можно синтезировать с использованием коммерческих устройств для синтеза нуклеиновых кислот (доступных, например, от Applied Biosystems, Foster City, CA), или их можно получать коммерчески (например, от Life Technologies, Rockville, MD). Таким образом, набор синтезированных олигонуклеотидов, имеющих конкретный набор кодонов, как правило, включает множество олигонуклеотидов с различными последовательностями, причем отличия определяются набором кодонов по всей последовательности. Олигонуклеотиды, используемые согласно изобретению, обладают последовательностями, которые позволяют гибридизацию с матричной нуклеиновой кислотой переменного домена, а также могут включать участки для ферментов рестрикции для целей клонирования.

В одном способе последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислоты вариантов, можно создавать олигонуклеотид-опосредуемым мутагенезом. Этот способ хорошо известен в данной области, как описано Zoller et al. *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6504(1987). В кратком изложении, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислоты вариантов, создают посредством гибридизации набора олигонуклеотидов, кодирующих требуемые наборы кодонов, с ДНК-матрицей, где матрица представляет собой одноцепочечную форму плазмиды, содержащую последовательность матричной нуклеиновой кислоты переменного участка. После гибридизации используют ДНК полимеразу для синтеза целой второй цепи, комплементарной матрице, которая таким образом, включает олигонуклеотидный праймер, и содержит наборы кодонов, обеспечиваемые набором олигонуклеотидов.

Как правило, используют олигонуклеотиды длиной по меньшей мере 25 нуклеотидов. Оптимальный олигонуклеотид имеет от 12 до 15 нуклеотидов, которые полностью комплементарны матрице с любой стороны от нуклеотида(ов), кодирующего мутацию (и). Это обеспечивает надлежащую гибридизацию олигонуклеотида с одноцепочечной молекулой ДНК-матрицы. Олигонуклеотиды легко синтезировать с использованием способов, известных в данной области, таких как способы, описанные Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

ДНК-матрицу получают либо с помощью векторов, которые образованы из векторов бактериофага M13 (подходящими являются коммерчески доступные векторы M13mp18 и M13mp19), либо с помощью векторов, которые содержат ориджин репликации одноцепочечного фага, как описано Viera et al., *Meth. Enzymol.* 153:3 (1987). Таким образом, ДНК, которая подлежит мутации, можно встраивать в один из этих векторов для получения одноцепочечной матрицы. Получение одноцепочечной матрицы описано

в разделах 4.21-4.41 Sambrook et al., выше.

Для изменения нативной последовательности ДНК, олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечной матрицей в подходящих условиях гибридизации. Затем добавляют фермент для полимеризации ДНК, обычно ДНК-полимеразу Т7 или фрагмент Кленова ДНК полимеразы I, для синтеза цепи, комплементарной матрице, с использованием олигонуклеотида в качестве праймера для синтеза. Таким образом, образуется гетеродуплексная молекула, так что одна цепь ДНК кодирует мутантную форму гена 1, а другая цепь (исходная матрица) кодирует нативную неизмененную последовательность гена 1. Затем эту гетеродуплексную молекулу трансформируют в

подходящую клетку-хозяина, обычно, прокариотическую клетку, такую как *E. coli* JM101. После выращивания клеток, их высевают на агарозные планшеты и подвергают скринингу с использованием олигонуклеотидного праймера, радиоактивно меченного 32-фосфатом для идентификации бактериальных колоний, которые содержат мутантную ДНК.

Описанный выше способ можно модифицировать так, чтобы образовывалась гомодуплексная молекула, где обе цепи плазмиды содержат мутацию(и). Модификации являются следующими: одноцепочечный олигонуклеотид подвергают отжигу с одноцепочечной матрицей, как описано выше. Смесь трех дезоксирибонуклеотидов, дезоксирибоаденозина (dATP), дезоксирибогуанозина (dGTP) и дезоксириботимидина (dTTP), комбинируют с модифицированным тиодезоксирибоцитозином, называемым dCTP-(aS) (который можно получить в Amersham). Эту смесь добавляют в комплекс матрица-олигонуклеотид. При добавлении ДНК-полимеразы к этой смеси, образуется цепь ДНК, идентичная матрице, за исключением мутантных оснований. Кроме того, эта новая цепь ДНК содержит dCTP-(aS) вместо dCTP, который служит для защиты его от рестрикционного расщепления эндонуклеазой. После разрезания матричной цепи двухцепочечного гетеродуплекса соответствующим ферментом рестрикции, матричную цепь можно расщеплять нуклеазой EhoIII или другой подходящей нуклеазой позади области, которая содержит участок(участки), подлежащий мутагенезу. Затем реакцию останавливают, чтобы осталась молекула, которая является только частично одноцепочечной. Затем образуют двухцепочечную гомодуплексную ДНК с использованием ДНК-полимеразы в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, АТР и ДНК-лигазы. Затем эту гомодуплексную молекулу можно трансформировать в подходящую клетку-хозяина.

Как указано ранее, последовательность олигонуклеотидов в наборе обладает длиной, достаточной для гибридизации с матричной нуклеиновой кислотой, а также может, но не обязательно, содержать участки рестрикции. ДНК-матрицу можно получать с помощью векторов, которые образованы либо из векторов бактериофага M13, либо из векторов, которые содержат ориджин репликации одноцепочечного фага, как описано Viera et al. Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Таким образом, ДНК, которая подлежит мутации, должна быть встроена в один из этих векторов для получения одноцепочечной матрицы. Получение одноцепочечной матрицы описано в разделах 4.21-4.41 Sambrook et al., выше.

Согласно другому способу, можно восстанавливать связывание антигена в процессе гуманизации антител посредством селекции репарированных гипервариабельных областей (см. заявку No. 11/061841, поданную 18 февраля 2005 года). Способ включает встраивание гипервариабельных областей, не являющихся человеческими, в акцепторную каркасную область и, кроме того, внесение одной или нескольких аминокислотных замен в одну или несколько гипервариабельных областей без модификации последовательности акцепторной каркасной области. Альтернативно внесение одной

или нескольких аминокислотных замен может сопровождаться модификациями в последовательности акцепторной каркасной области.

Согласно другому способу, библиотеку можно создавать путем предоставления наборов вышерасположенных и нижерасположенных олигонуклеотидов, причем каждый набор имеет множество олигонуклеотидов с различными последовательностями, причем различные последовательности определяются наборами кодонов, представленными в последовательности олигонуклеотидов. Наборы вышерасположенных и нижерасположенных олигонуклеотидов, вместе с последовательностью матричной нуклеиновой кислоты вариабельного домена, можно использовать в полимеразной цепной реакции для создания "библиотеки" продуктов ПЦР. Продукты ПЦР могут называться "кассетами нуклеиновых кислот", поскольку их можно подвергать слиянию с другими родственными или неродственными последовательностями нуклеиновых кислот, например, для белков вирусной оболочки и доменов димеризации, с использованием общепринятых способов молекулярной биологии.

Последовательность праймеров для ПЦР включает один или несколько сконструированных наборов кодонов для доступных для растворителя и высоко разнообразных положений в гипервариабельной области. Как описано выше, набор кодонов представляет собой набор различных последовательностей нуклеотидных триплетов, используемых для кодирования требуемых аминокислот варианта.

Подвергнутые селекции антитела, которые удовлетворяют требуемым критериям, поскольку их отбирают через соответствующие стадии скрининга/селекции, можно выделять и клонировать с использованием стандартных рекомбинантных способов.

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других положительных биологических свойств. Для достижения этой цели, в соответствии с предпочтительным способом, гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа исходных последовательностей и различных предполагаемых гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются широко доступными и известны специалистам в данной области. Доступными являются компьютерные программы, которые иллюстрируют и выводят на экран возможные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей иммуноглобулинов-кандидатов. Исследование этих выведенных на экран данных позволяет проводить анализ возможной роли остатков в функционировании предполагаемых последовательностей иммуноглобулинов, т.е., анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связывать свой антиген. Таким образом, можно отобрать остатки FR и комбинировать их из реципиентной и импортной последовательностей таким образом, чтобы были достигнуты требуемые свойства антител, такие как повышенная аффинность к антигену (ам)-мишени. Как правило, остатки гипервариабельной области оказывают непосредственное и наиболее значительное влияние на связывание антигена.

Предусмотрены различные формы гуманизированных антител против CD79b. Например, гуманизированное антитело может представлять собой фрагмент антитела, такой как Fab, который необязательно конъюгирован с одним или несколькими цитотоксическим средством(ами) для получения иммуноконъюгата. Альтернативно гуманизированное антитело может представлять собой интактное антитело, такое как интактное антитело IgG1.

В качестве альтернативы гуманизации, можно получать антитела человека. Например, в настоящее время возможным является получение трансгенных животных (например,

мышей), которые способны, при иммунизации, продуцировать полный набор антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена участка соединения тяжелых цепей антител (J_H) у химерных мышей и мутантных мышей зародышевой линии приводит к полному

ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос системы генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека в таких мутантных мышей зародышевой линии приводит к продукции антител человека при антигенной стимуляции. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); и патенты США No. 5545806, 5569825, 5591669 (все GenPharm), 5545807; и WO 97/17852.

Альтернативно для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro* можно использовать технологию фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)), из наборов генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов неиммунизированных доноров. В соответствии с этим способом, гены V домена антител клонируют в рамке считывания либо главного, либо второстепенного гена оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и они экспонируются в качестве функциональных фрагментов антител на поверхности частицы фага. Вследствие того, что нитевидная частица содержит одноцепочечную копию ДНК генома фага, селекция на основе функциональных свойств антитела также приведет к селекции гена, кодирующего антитело, проявляющее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые из свойств В-клетки. Фаговый дисплей можно проводить в различных формах, рассмотренных например, в Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея можно использовать несколько источников сегментов V-генов. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), выделили набор разнообразных антител против оксазолон из небольшой случайной комбинаторной библиотеки V-генов, полученной из селезенок иммунизированных мышей. Можно сконструировать набор V-генов из неиммунизированных доноров-людей и можно выделять антитела против широкого набора антигенов (в том числе против собственных антигенов), главным образом, в соответствии со способами, описанными Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), или Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). См., также, патенты США No. 5565332 и 5573905.

Как рассмотрено выше, антитела человека также можно получать посредством активированных В-клеток *in vitro* (см. патенты США 5567610 и 5229275).

4. Фрагменты антител

В некоторых случаях преимущественным является использование фрагментов антител, вместо целых антител. Меньший размер фрагментов позволяет быстрое выведение, и может обеспечить улучшенный доступ к солидным опухолям.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные способы. Традиционно, эти фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако эти фрагменты в настоящее время можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут быть экспрессированы и секретированы в *E. coli*, таким образом, позволяя простой способ получения больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, описанных выше. Альтернативно фрагменты Fab'-SH можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически связывать с получением фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом

фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Fab- и F(ab')₂-фрагмент с повышенным временем полужизни *in vivo*, содержащий остатки связывающего рецептор спасения эпитопа, описан в патенте США No. 5869046. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны 5 квалифицированному специалисту. В других вариантах осуществления предпочтительное для выбора антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патент США No. 5571894; и патент США No. 5587458. Fv и sFv являются единственными типами с интактными антиген-связывающими участками, которые лишены константных участков; таким образом, они подходят для снижения 10 неспецифического связывания в ходе применения *in vivo*. Можно конструировать слитые с sFv белки с получением эффекторного белка либо на N-, либо на C- конце sFv. См. Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой "линейное антитело", например, как описано в патенте США 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

15 5. Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере двух различных эпитопов. Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными 20 эпитопами полипептида CD79b, описанного в настоящем документе. Другие такие антитела могут сочетать в себе указанный выше участок связывания CD79b и участок (ки) связывания других белков. Альтернативно плечо против CD79b можно комбинировать с плечом, которое связывается с триггерной молекулой на лейкоците, такой как молекула T-клеточного рецептора (например CD3), или Fc-рецепторы для IgG (FcγR), такие как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), так чтобы 25 сосредоточить и локализовать механизмы клеточной защиты на экспрессирующих CD79b клетках. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических средств в клетках, которые экспрессируют CD79b. Эти антитела обладают CD79b-связывающим плечом и плечом, которое связывает цитотоксическое средство (например, сапорин, антитело против интерферона-α, алкалоид барвинка, А- 30 цепь рицина, метотрексат или гаптен с радиоактивным изотопом). Биспецифические антитела можно получать в качестве интактных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂-биспецифические антитела).

В WO 96/16673 описано биспецифическое антитело против ErbB2/FcγRIII, и в патенте 35 США No. 5837234 описано биспецифическое антитело против ErbB2/FcγRI. Биспецифическое антитело против ErbB2/Fcα представлено в WO98/02463. В патенте США No. 5821337 описано биспецифическое антитело против ErbB2/CD3.

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Общепринятый способ получения интактных биспецифических антител основан на 40 совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулинов, где две цепи обладают различной специфичностью (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайной сборки тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, такие гибридомы (квадромы) потенциально продуцируют смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна обладает правильной биспецифичной структурой. Очистка правильных молекул, которую обычно проводят посредством стадий аффинной 45 хроматографии, является довольно трудоемкой и выход продукта является низким. Аналогичные способы описаны в WO 93/08829, и в Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом проводят слияние переменных доменов антитела с требуемой специфичностью связывания (участками связывания антитело-антиген) с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Предпочтительно проводят слияние с константным доменом тяжелой цепи Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, C_H2 и C_H3. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере один из компонентов, предназначенных для слияния, обладал первым константным доменом тяжелой цепи (C_H1), содержащим участок, необходимый для связывания легкой цепи. ДНК, кодирующую предназначенные для слияния компоненты тяжелых цепей иммуноглобулинов и, если желательно, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы, и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает значительную гибкость при регулировании соотношений трех полипептидных фрагментов друг с другом в вариантах осуществления, где неравные соотношения трех полипептидных цепей в конструкции обеспечивает оптимальный выход требуемого биспецифического антитела. Однако возможным является встраивание двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высокому выходу продукта или если соотношения не имеют существенного влияния на требуемое сочетание цепей.

В предпочтительном варианте осуществления этого подхода, биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с одной специфичностью связывания на одном плече, и пары тяжелая цепь-легкая цепь гибридного иммуноглобулина (обладающей другой специфичностью связывания) на другом плече. Было обнаружено, что такая асимметричная структура облегчает разделение требуемого биспецифического соединения и нежелательных сочетаний цепей иммуноглобулинов, поскольку наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Этот подход описан в WO 94/04690. Для более подробного описания получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в патенте США No. 5731168, для максимального увеличения процентного количества гетеродимеров, которые выделяют из рекомбинантных клеточных культур можно сконструировать область контакта между парой молекул антител. Предпочтительная область контакта содержит по меньшей мере часть C_H3-домена константного домена антитела. В этом способе, одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот из области контакта первой молекулы антитела заменяют на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). В области контакта второй молекулы антитела создают компенсирующие "полости" идентичного или сходного с крупной боковой цепью(ями) размера посредством замены крупных боковых цепей аминокислот на цепи меньших размеров (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм для повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают поперечно-сшитые антитела или "гетероконъюгаты" антител. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы против нежелательных клеток (патент США No. 4676980), и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373,

и EP 03089). Гетероконъюгаты антител можно получать с использованием любого подходящего способа поперечного сшивания. Подходящие средства для поперечного сшивания хорошо известны в данной области, и описаны в патенте США No. 4676980, совместно с рядом способов поперечного сшивания.

Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифические антитела можно получать с использованием образования химических связей. В Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) описан способ, где интактные антитела протеолитически расщепляют с получением F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии вещества, образующего комплексы с дитиолами, арсенита натрия, для стабилизации соседних дитиолов и предотвращения образования межмолекулярного дисульфида. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные с тионитробензоатом (TNB). Одно из производных Fab'-TNB затем повторно превращают в Fab'-тиол восстановлением меркаптоэтиламинам и смешивают с эквимоллярным количеством другого производного Fab'-TNB с получением биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

Последние достижения упростили прямое выделение из *E. coli* фрагментов Fab'-SH, которые можно химически связывать с получением биспецифических антител. В Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) описано получение полностью гуманизированной молекулы F(ab')₂ биспецифического антитела. Осуществляли секрецию из *E. coli* каждого Fab'-фрагмента по отдельности и их подвергали прямому химическому соединению *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Биспецифическое антитело, полученное таким образом, обладало способностью связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2, и нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против мишеней, представляющих собой рак молочной железы человека.

Также были описаны различные способы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Например, были получены биспецифические антитела с использованием лейциновых молний. Kositelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии белков Fos и Jun связывали с Fab'-участками двух различных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области с получением мономеров, а затем повторно окисляли с получением гетеродимеров антител. Этот способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Способ "димеров антител", описанный Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:6444-6448 (1993) обеспечивает альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат V_H, связанный с V_L посредством линкера, который является слишком коротким для возможности образования пары между двумя доменами на одной и той же цепи. Таким образом, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента, таким образом, формируя два антиген-связывающих центра. Также описана другая стратегия для получения фрагментов биспецифических антител с использованием димеров одноцепочечных Fv (sFv). См. Gruber et al., J. Immunol, 152: 5368 (1994).

Также предусмотрены антитела более чем с двумя валентностями. Например, можно получать триспецифичные антитела. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

6. Гетероконъюгаты антител

Гетероконъюгаты антител также относятся к объему настоящего изобретения.

Гетероконъюгаты антител состоят из двух ковалентно связанных антител. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки [патент США No. 4676980], и для лечения ВИЧ-инфекции [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Предусматривается, что антитела можно получать *in vitro* с использованием известных способов химии синтетических белков, включая способы, вовлекающие поперечно-сшивающие агенты. Например, иммунотоксины можно конструировать с использованием реакции дисульфидного обмена или посредством образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат и реагенты, описанные, например, в патенте США No. 4676980.

7. Поливалентные антитела

Поливалентное антитело может интернализываться (и/или катаболизироваться) быстрее, чем двухвалентное антитело, клеткой, экспрессирующей антиген, с которым антитела связываются. Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой поливалентные антитела (которые могут относиться к классу, отличному от класса IgM) с тремя или более антиген-связывающими участками (например, четырехвалентные антитела), которые можно легко получать посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антиген-связывающих участков. Предпочтительный домен димеризации содержит (или состоит из них) Fc-участок или шарнирную область. В этом случае, антитело будет содержать Fc-область и три или более антиген-связывающих участка со стороны N-конца Fc-участка. Предпочтительное поливалентное антитело, представленное в настоящем документе, содержит (или состоит из них) от трех до приблизительно восьми, однако предпочтительно четыре, антиген-связывающих участка. Поливалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидные цепи), где полипептидная цепь(и) содержит два или более переменных доменов. Например, полипептидная цепь(и) может содержать VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc-участка, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или полипептид, и n равно 0 или 1. Например, полипептидная цепь(и) может содержать: цепь VH-CH1-подвижный линкер-VH-CH1-Fc-участок; или цепь VH-CH1-VH-CH1-Fc-участок. Поливалентное антитело, представленное в настоящем документе, предпочтительно дополнительно содержит по меньшей мере два (и предпочтительно четыре) полипептида переменного домена легкой цепи. Поливалентное антитело, представленное в настоящем документе, например, может содержать от приблизительно двух до приблизительно восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Полипептиды переменного домена легкой цепи, рассматриваемые в настоящем документе, содержат переменный домен легкой цепи и, необязательно, дополнительно содержат CL-домен.

8. Изменение эффекторных функций с помощью методов генной инженерии

Может быть желательной модификация антитела по изобретению в отношении эффекторной функции, например, чтобы усилить антигензависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) антитела. Этого можно достигать внесением одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-участок антитела. Альтернативно, или дополнительно, в Fc-участок можно вносить остаток(и) цистеина, обеспечивая, таким образом,

формирование дисульфидной связи между цепями в этом участке. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или усиленным комплемент-зависимым уничтожением клеток и повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). См. Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) и Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также можно получать с использованием гетеробифункциональных поперечносшитых линкеров, как описано в Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Альтернативно можно сконструировать антитело, которое обладает дублированными Fc-участками и, таким образом, может обладать повышенной способностью в отношении лизиса комплементом и ADCC. См. Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Для увеличения времени полужизни антитела в сыворотке, можно встраивать в антитело (особенно во фрагмент антитела) связывающий рецептор спасения эпитоп, как описано, например, в патенте США 5739277. Как используют в рамках настоящей заявки, термин "связывающий рецептор спасения эпитоп" относится к эпитопу Fc-участка молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), который отвечает за повышение периода полураспада в сыворотке молекулы IgG *in vivo*.

9. Иммуноконъюгаты

Изобретение также относится к иммуноконъюгатам (взаимозаменяемо обозначаемым как "конъюгаты антитело-лекарственное средство" или "ADC"), содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, ингибирующее рост средство, токсин (например, ферментативно активный токсин бактерий, грибов, растений или животных, или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е., радиоконъюгат).

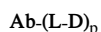
В определенных вариантах осуществления, иммуноконъюгат содержит антитело и химиотерапевтическое средство или другой токсин. Химиотерапевтические средства, подходящие для получения таких иммуноконъюгатов, описаны выше. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают в себя А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки-диантаны, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Для получения радиоконъюгированных антител доступны различные радионуклиды. Их примеры включают ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re. Конъюгаты антитела и цитотоксического средства можно получать с использованием множества бифункциональных связывающих белки веществ, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидозэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола), и вторичные активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин на основе рицина можно получать, как описано в Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). Меченая углеродом 14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой иллюстративный хелатирующий агент для конъюгации радионуклеотида с антителом. См. WO94/11026.

Также в настоящем документе предусматриваются конъюгаты антитела и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, пептиды ауристатины, такие как монометилауристин (ММАЕ) (синтетический аналог доластатины), майтанзиноиды, такие как DM1, трихотен и CC1065, и производные этих

токсинов, которые обладают активностью токсинов.

Иллюстративные иммуноконъюгаты - конъюгаты антитело-лекарственное средство

Иммуноконъюгат (или "конъюгат антитело-лекарственное средство" ("ADC")) по изобретению может иметь формулу I, ниже, где антитело конъюгировано (т.е., ковалентно связано) с одной или несколькими группами лекарственного средства (D) через необязательный линкер (L). ADC могут включать конъюгаты тиио-MAb и лекарственного средства ("TDC").



(I)

Таким образом, антитело может быть конъюгировано с лекарственным средством либо прямо, либо через линкер. В формуле I, p представляет собой среднее количество групп лекарственного средства на антитело, которое может варьировать, например, от приблизительно 1 до приблизительно 20 групп лекарственного средства на антитело, и в определенных вариантах осуществления, от 1 до приблизительно 8 групп лекарственного средства на антитело. Изобретение относится к композиции, содержащей смесь соединений антитело-лекарственное средство соединения формулы I, где средняя нагрузка лекарственным средством на антитело составляет от приблизительно 2 до приблизительно 5, или от приблизительно 3 до приблизительно 4.

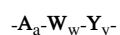
а. Иллюстративные линкеры

Линкер может содержать один или несколько линкерных компонентов.

Иллюстративные линкерные компоненты включают 6-малеимидокапроил ("MC"), малеимидопропаноил ("MP"), валин-цитруллин ("val-cit" или "vc"), аланин-фенилаланин ("ala-phe"), п-аминобензилоксикарбонил ("PAB"), и линкерные компоненты, получаемые конъюгацией с линкерными реагентами: N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат ("SPP"), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат ("SMCC", также обозначаемый в настоящем документе как "MCC"), и N-сукцинимидил-(4-йодоацетил)аминобензоат ("SIAB"). В данной области известны различные линкерные компоненты, некоторые из которых описаны ниже.

Линкер может представлять собой "расщепляемый линкер", облегчающий высвобождение лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать чувствительный к действию кислот линкер (например, гидразон), чувствительный к протеазам (например, чувствительный к пептидазе) линкер, фотолabile линкер, диметилловый линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992); патент США No. 5208020).

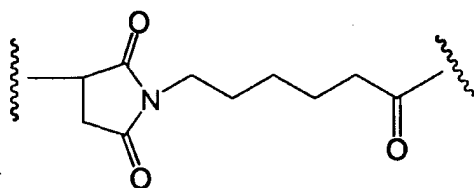
В определенных вариантах осуществления, линкер является таким, как показано в следующей формуле II:



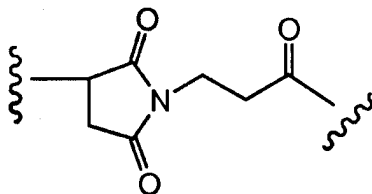
(II)

где A представляет собой удлиняющий элемент, и a представляет собой целое число от 0 до 1; W представляет собой аминокислотный элемент, и w представляет собой целое число от 0 до 12; Y представляет собой спейсерный элемент, и y равен 0, 1 или 2; и Ab, D и r являются такими, как определено выше для формулы I. Иллюстративные варианты осуществления таких линкеров описаны в US 2005-0238649 A1, который включен в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

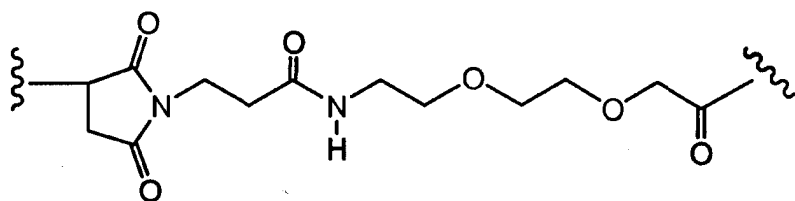
В некоторых вариантах осуществления, линкерный компонент может содержать "удлиняющий элемент", который связывает антитело с другим линкерным компонентом или с группой лекарственного средства. Иллюстративные удлиняющие элементы представлены ниже (где волнистой линией указаны участки ковалентного присоединения к антителу):



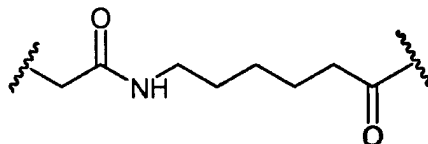
MC



MP



MPEG



В некоторых вариантах осуществления, линкерный компонент может содержать аминокислотный элемент. В одном таком варианте осуществления, аминокислотный элемент позволяет расщепление линкера протеазой, тем самым облегчая высвобождение лекарственного средства из иммуноконъюгата под воздействием внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты. См., например, Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778-784. Иллюстративные аминокислотные элементы включают, но не ограничиваются ими, дипептид, трипептид, тетрапептид и пентапептид. Иллюстративные дипептиды включают: валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe); фенилаланин-лизин (fk или phe-lys); или N-метил-валин-цитруллин (Me-val-cit). Иллюстративные трипептиды включают: глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотный элемент может содержать аминокислотные остатки, которые встречаются в природе, а также минорные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные элементы можно конструировать и оптимизировать в отношении их селективности для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, ассоциированной с опухолью протеазой, катепсином В, С и D, или протеазой плазмينا.

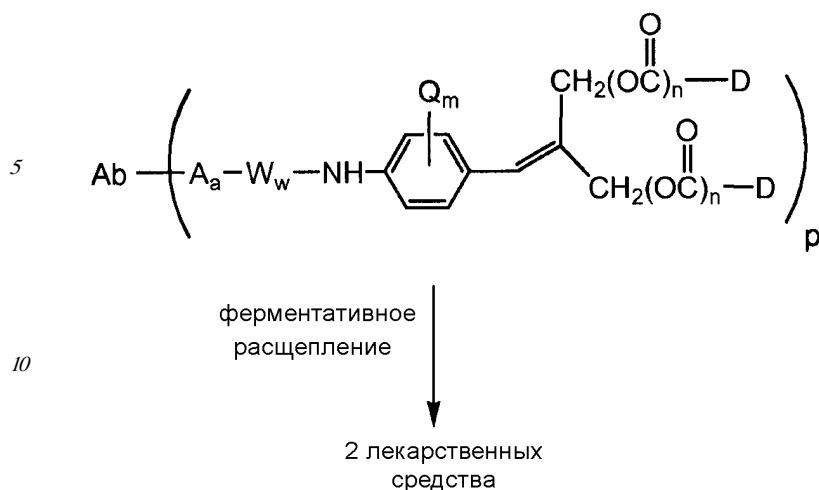
В некоторых вариантах осуществления, линкерный компонент может содержать "спейсерный" элемент, который связывает антитело с группой лекарственного средства, либо прямо, либо посредством удлиняющего элемента и/или аминокислотного элемента.

Спейсерный элемент может быть "самоотщепляющимся" или "не способным к самостоятельному отщеплению". "Не способный к самостоятельному отщеплению" спейсерный элемент представляет собой элемент, в котором часть спейсерного элемента или весь спейсерный элемент остается связанным с группой лекарственного средства при ферментативном (например, протеолитическом) расщеплении ADC. Примеры не способных к самостоятельному отщеплению спейсерных элементов включают, но не ограничиваются ими, глициновый спейсерный элемент и глицин-глициновый спейсерный элемент. Также предусматриваются другие сочетания пептидных спейсеров, чувствительные к специфичному к последовательности ферментативному расщеплению. Например, ферментативное расщепление ADC, содержащего глицин-глициновый спейсерный элемент, ассоциированной с опухолевыми клетками протеазой, может приводить к отсоединению группы глицин-глицин-лекарственное средство от остальной части ADC. В одном из таких вариантов осуществления, группу глицин-глицин-лекарственного средства затем подвергают отдельной стадии гидролиза в опухолевой клетке, таким образом, отщепляя глицин-глициновый спейсерный элемент от группы лекарственного средства.

"Самоотщепляющийся" спейсерный элемент позволяет высвобождение группы лекарственного средства без отдельной стадии гидролиза. В определенных вариантах осуществления, спейсерный элемент линкера содержит п-аминобензильный элемент.

В одном таком варианте осуществления, п-аминобензиловый спирт связывают с аминокислотным элементом через амидную связь, и получают карбамат, метилкарбамат или карбонат между бензиловым спиртом и цитотоксическим средством. См., например, Namann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15: 1087-1103. В одном варианте осуществления, спейсерный элемент представляет собой п-аминобензилоксикарбонил (PAB). В определенных вариантах осуществления, фениленовую часть п-аминобензильного элемента замещают посредством Qm, где Q представляет собой -C₁-C₈алкил, -O-(C₁-C₈алкил), -галоген, -нитро или -циано; и m представляет собой целое число в диапазоне 0-4. Примеры самоотщепляющихся спейсерных элементов, кроме того, включают, но не ограничиваются ими, ароматические соединения, которые являются электронно сходными с п-аминобензиловым спиртом (см., например, US 2005/0256030 A1), такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто- или пара-аминобензилацетали. Можно использовать спейсеры, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223); соответствующим образом замещенные бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2] кольцевые системы (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc, 1972, 94, 5815); и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867). Удаление амин-содержащих лекарственных средств, которые замещены в α-положении глицина (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) также является примером самоотщепляющихся спейсеров, подходящих для ADC.

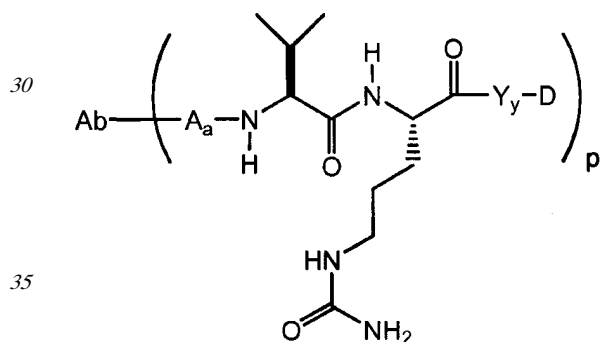
В одном варианте осуществления, спейсерный элемент представляет собой разветвленный бис(гидроксиметил)стирольный (BHMS) элемент, изображенный ниже, который можно использовать для включения и высвобождения множества лекарственных средств.



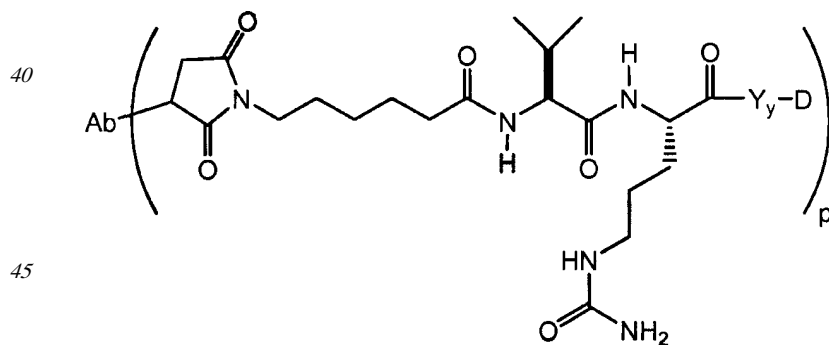
15 где Q представляет собой -C₁-C₈алкил, -O-(C₁-C₈алкил), -галоген, -нитро или -циано;
m представляет собой целое число в диапазоне 0-4; n представляет собой 0 или 1; и p
находится в диапазоне от 1 до приблизительно 20.

В другом варианте осуществления, линкер L может представлять собой линкер
дендритного типа для ковалентного присоединения более одной группы лекарственного
20 средства посредством ветвящейся многофункциональной линкерной группы к антителу
(Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003)
Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768). Дендритные линкеры могут повышать
молярное соотношение лекарственного средства и антитела, т.е. нагрузку, которая
связана с эффективностью ADC. Таким образом, когда антитело со встроенными в
25 него остатками цистеина обладает только одной реактивной тиольной группой цистеина,
множество групп лекарственного средства можно связывать через дендритный линкер.

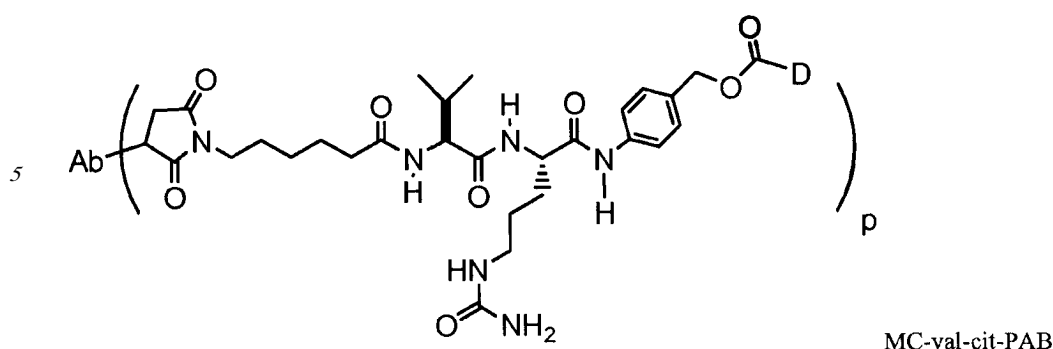
Иллюстративные линкерные компоненты и их сочетания представлены ниже в
контексте ADC формулы II:



Val-Cit или VC



MC-val-cit



10 Линкерные компоненты, включая удлиняющие, спейсерные и аминокислотные элементы, можно синтезировать способами, известными в данной области, такими как способы, описанные в US 2005-0238649 A1.

б. Иллюстративные группы лекарственного средства

(1) Майтанзин и майтанзиноиды

15 В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами майтанзиноида. Майтанзиноиды представляют собой ингибиторы митоза, которые действуют, ингибируя полимеризацию тубулина. Майтанзин впервые был выделен из восточно-африканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США No. 3896111). Впоследствии, было открыто, что
 20 определенные микроорганизмы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и С-3 сложные эфиры майтанзинола (патент США No. 4151042). Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги описаны, например, в патентах США No. 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219;
 25 4450254; 4362663 и 4371533.

Майтанзиноидные группы лекарственного средства являются привлекательными группами лекарственного средства в конъюгатах антитело-лекарственное средство, поскольку они: (i) относительно доступны для получения ферментацией или химической модификацией или преобразованием в производное продуктов ферментации, (ii)
 30 поддаются преобразованию в производные с помощью функциональных групп, подходящих для конъюгации через дисульфидные и недисульфидные линкеры с антителами, (iii) являются стабильными в плазме, и (iv) являются эффективными против различных опухолевых клеточных линий.

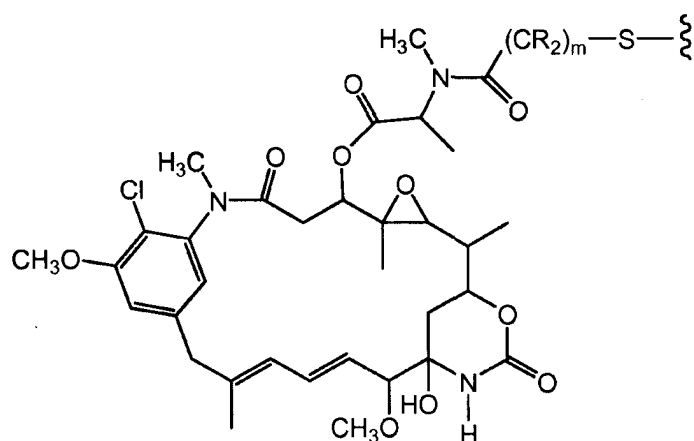
35 Соединения майтанзина, подходящие для применения в качестве майтанзиноидных групп лекарственного средства, хорошо известны в данной области и их можно выделять из природных источников в соответствии с известными способами или получать с использованием способов генетической инженерии и ферментации (US 6790952; US 2005/0170475; Yu et al. (2002) PNAS 99: 7968-7973). Майтанзинол и аналоги майтанзинола также можно получать синтетически известными способами.

40 Иллюстративные майтанзиноидные группы лекарственного средства включают группы, имеющие модифицированное ароматическое кольцо, такое как: С-19-дехлор (патент США No. 4256746) (получаемый восстановлением с помощью алюмогидрида лития ансамитоцина Р2); С-20-гидроксид (или С-20-деметил) +/-С-19-дехлор (патенты США No. 4361650 и 4307016) (получаемый деметилированием с использованием
 45 *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорированием с использованием LАH); и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США No. 4294757) (получаемый ацилированием с использованием ацилхлоридов), и группы, имеющие модификации в других положениях.

Иллюстративные майтанзиноидные группы лекарственных средств также включают группы, имеющие модификации, такие как: C-9-SH (патент США No. 4424219) (получаемый реакцией майтанзинола с H_2S или P_2S_5); C-14-алкоксиметил(деметокси/ CH_2OR)(US 4331598); C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH_2OH или CH_2OAc) (патент США No. 4450254) (получаемый от *Nocardia*); C-15-гидрокси/ацилокси (US 4364866) (получаемый превращением майтанзинола посредством *Streptomyces*); C-15-метокси (патенты США No. 4313946 и 4315929) (выделяемый из *Trewia nudiflora*); C-18-N-деметил (патенты США No. 4362663 и 4322348) (получаемый деметилированием майтанзинола посредством *Streptomyces*); и 4,5-дезоксид (US 4371533) (получаемый восстановлением майтанзинола трихлоридом титана/LAH).

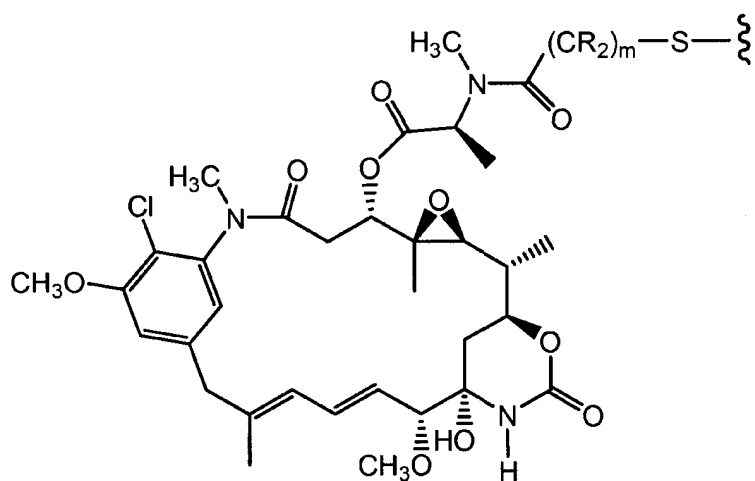
Известно, что множество положений соединений майтанзина являются подходящими в качестве положений для связывания, в зависимости от типа связи. Например, для образования сложноэфирной связи, подходят положение C-3, имеющее гидроксильную группу, положение C-14, модифицированное гидроксиметилом, положение C-15, модифицированное гидроксильной группой и положение C-20, имеющее гидроксильную группу (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

Майтанзиноидные группы лекарственного средства включают группы, имеющие структуру:

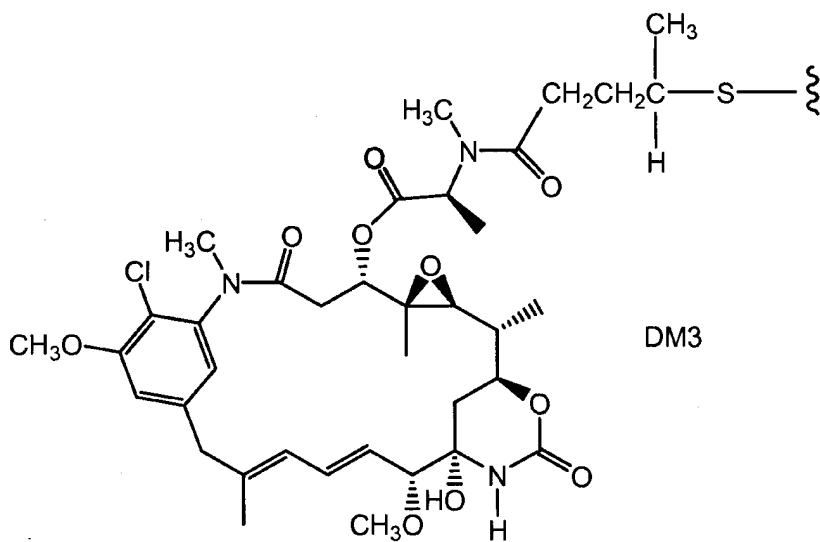
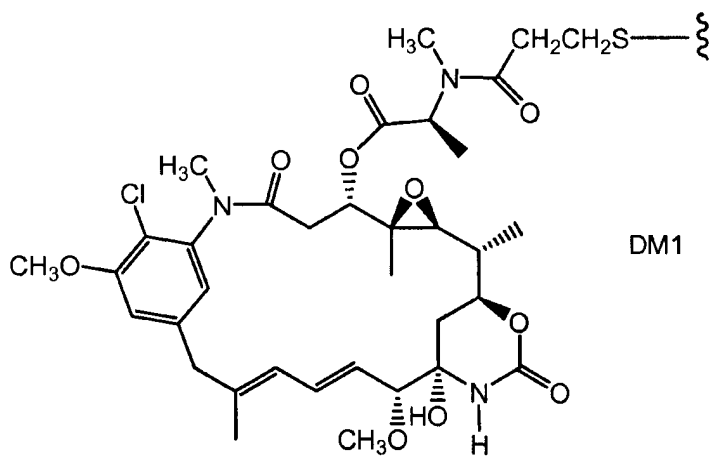


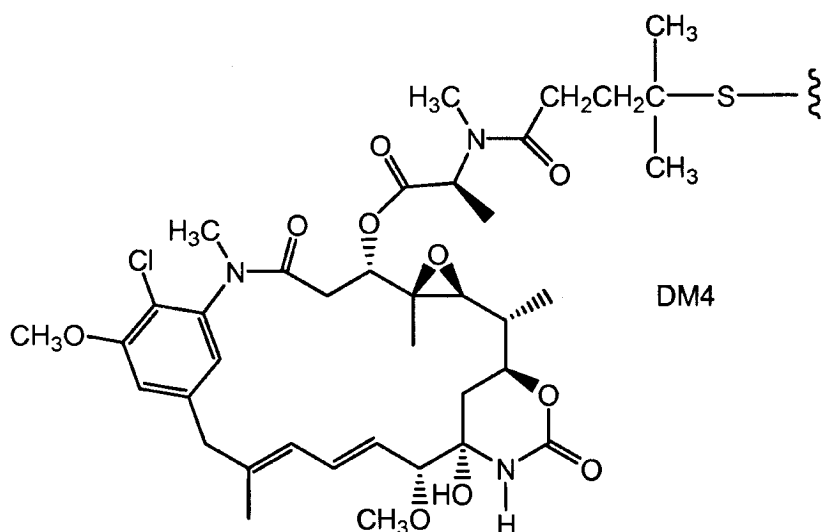
где волнистой линией указано ковалентное присоединение атома серы майтанзиноидной группы лекарственного средства к линкеру на ADC. R может независимо представлять собой H или C_1 - C_6 алкил. Алкиленовая цепь, связывающая амидную группу с атомом серы, может представлять собой метанил, этанил или пропил, т.е., m равно 1, 2 или 3 (US 633410; US 5208020; US 7276497; Chari et al. (1992) Cancer Res. 52: 127-131; Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93: 8618-8623).

Для соединений по изобретению предусматриваются все стереоизомеры майтанзиноидной группы лекарственного средства, т.е. любое сочетание R- и S-конфигураций в хиральных углеродах в D. В одном варианте осуществления, майтанзиноидная группа лекарственного средства имеет следующую стереохимию:



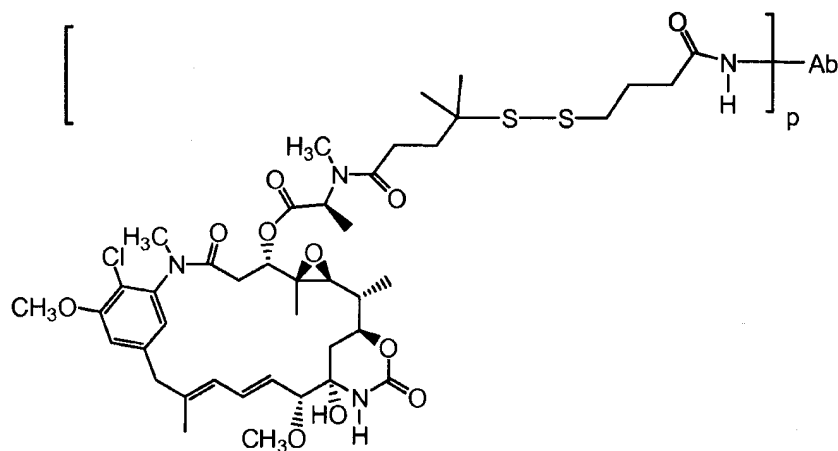
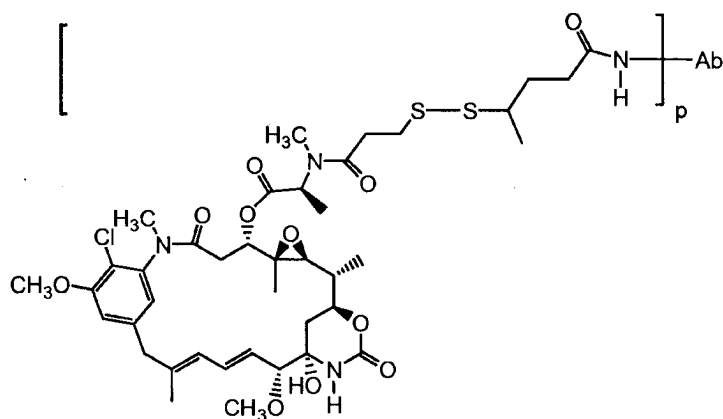
Иллюстративные варианты осуществления майтанзиноидных групп лекарственного средства включают: DM1; DM3 и DM4, имеющие структуры:



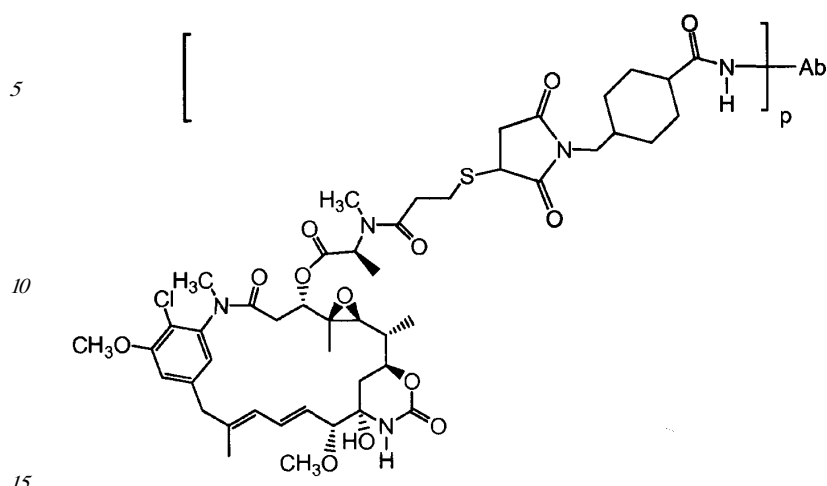


где волнистой линией указано ковалентное присоединение атома серы лекарственного средства к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство. (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A1).

Другие иллюстративные конъюгаты антитело-майтаниноидное лекарственное средство имеют следующие структуры и сокращения (где Ab представляет собой антитело и p равно от 1 до приблизительно 8):

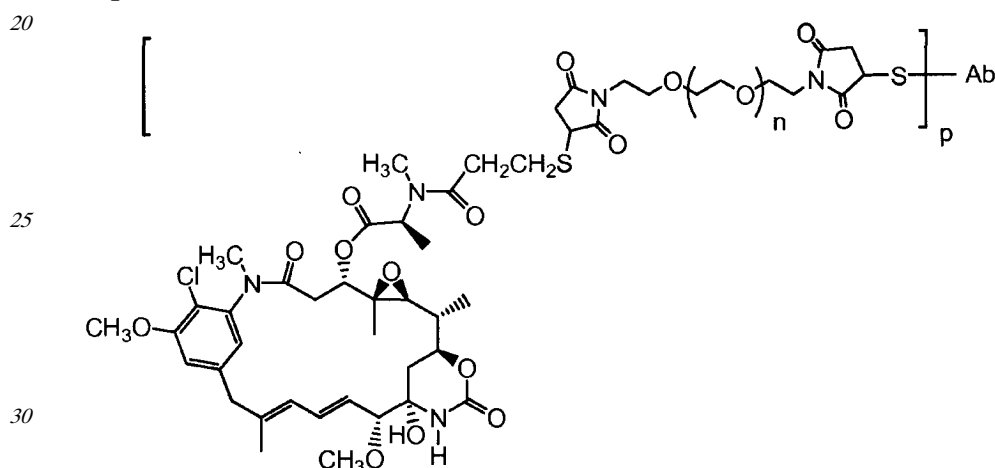


Ab-SPDB-DM4



Ab-SMCC-DM1

Иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство, где DM1 связан через линкер ВМРЕО с тиольной группой антитела, имеют следующую структуру и сокращение:



где Ab представляет собой антитело; n равно 0, 1 или 2; и p равно 1, 2, 3 или 4.

Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения, и их терапевтическое применение описаны, например, в Erickson, et al. (2006) Cancer Res. 66 (8):4426-4433; патентах США No. 5208020, 5416064, US 2005/0276812 A1, и патенте Европы EP 0 425 235 B1, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме.

Конъюгаты антитело-майтанзиноид получают химическим связыванием антитела с молекулой майтанзиноида без существенного снижения биологической активности либо антитела, либо молекулы майтанзиноида. См., например, патент США No. 5208020 (описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме). Майтанзиноиды можно синтезировать известными способами или выделять из природных источников. Подходящие майтанзиноиды описаны, например, в патенте США No. 5208020 и в других патентах и непатентных публикациях, указанных в настоящем документе выше, такие как майтанзинол и аналоги майтанзинола, модифицированные в ароматическом кольце или в других положениях молекулы майтанзинола, такие как различные сложные эфиры майтанзинола.

Для получения конъюгатов антитело-майтанзиноид существует множество линкерных

групп, известных в данной области, включая, например, линкерные группы, описанные в патенте США No. 5208020 или в патенте EP 0 425 235 B1; Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992); и US 2005/016993 A1, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме. Конъюгаты антитело-майтаниноид, содержащие линкерный компонент SMCC, можно получать, как описано в US 2005/0276812 A1, "Antibody-drug conjugates and Methods". Линкеры содержат дисульфидные группы, простые тиоэфирные группы, неустойчивые к действию кислот группы, фотолabile группы, неустойчивые к пептидазам группы, или неустойчивые к эстеразе группы, как описано в указанных выше патентах. Дополнительные линкеры описаны и проиллюстрированы в настоящем документе.

Конъюгаты антитела и мйтаниноида можно получать с использованием множества бифункциональных средств для присоединения белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидозэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат), и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В определенных вариантах осуществления, связывающий агент представляет собой N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) или N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP), обеспечивающие дисульфидную связь.

Линкер можно связывать с молекулой мйтаниноида в различных положениях, в зависимости от типа связи. Например, сложноэфирную связь можно образовывать посредством реакции с гидроксильной группой с использованием общепринятых способов присоединения. Реакция может протекать в положении C-3, имеющем гидроксильную группу, положении C-14, модифицированном гидроксиметилом, положении C-15, модифицированном гидроксильной группой, и положении C-20, имеющем гидроксильную группу. В одном варианте осуществления, связь образуется в положении C-3 мйтанинола или аналога мйтанинола.

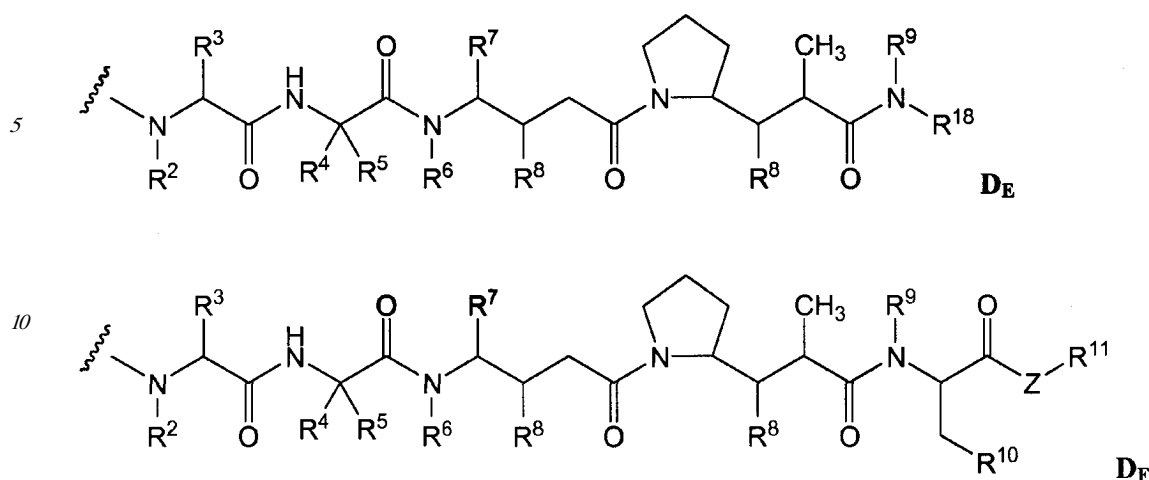
(2) Ауристатин и доластатин

В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с доластатином или с пептидным аналогом или производным доластатина, например, ауристатином (патенты США No. 5635483; 5780588). Было показано, что доластатин и ауристатин нарушают динамику микротрубочек, гидролиз GTP и деление ядер и клеток (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают активностью против злокачественной опухоли (патент США No. 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Группу лекарственного средства в виде доластатина или ауристатина можно связывать с антителом через N(амино)-конец или C(карбоксильный)-конец пептидной группы лекарственного средства (WO 02/088172).

Иллюстративные варианты осуществления ауристатина включают связывающиеся через N-конец группы лекарственного средства в виде монометилауристатина DE и DF (US2005/0238649, описанный в Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, представленный 28 марта 2004 года, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме).

Пептидная группа лекарственного средства может быть выбрана из формул D_E и

D_F, ниже:



где волнистой линией в D_E и D_F указан участок ковалентного связывания с антителом или с группой антитело-линкерный компонент, и независимо в каждом положении:

R² выбран из H и C₁-C₈алкила;

R³ выбран из H, C₁-C₈алкила, C₃-C₈карбоцикла, арила, C₁-C₈алкиларила, C₁-C₈алкил-(C₃-C₈карбоцикла), C₃-C₈гетероцикла и C₁-C₈алкил-(C₃-C₈гетероцикла);

R⁴ выбран из H, C₁-C₈алкила, C₃-C₈карбоцикла, арила, C₁-C₈алкиларила, C₁-C₈алкил-(C₃-C₈карбоцикла), C₃-C₈гетероцикла и C₁-C₈алкил-(C₃-C₈гетероцикла);

R⁵ выбран из H и метила;

или R⁴ и R⁵ вместе образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу -(CR^aR^b)_n-, где R^a и R^b независимо выбраны из H, C₁-C₈алкила и C₃-C₈карбоцикла и n выбран из 2, 3, 4, 5 и 6;

R⁶ выбран из H и C₁-C₈алкила;

R⁷ выбран из H, C₁-C₈алкила, C₃-C₈карбоцикла, арила, C₁-C₈алкиларила, C₁-C₈алкил-(C₃-C₈карбоцикла), C₃-C₈ гетероцикла и C₁-C₈алкил-(C₃-C₈гетероцикла);

каждый R⁸ независимо выбран из H, OH, C₁-C₈алкила, C₃-C₈карбоцикла и O-(C₁-C₈алкила);

R⁹ выбран из H и C₁-C₈алкила;

R¹⁰ выбран из арила или C₃-C₈гетероцикла;

Z представляет собой O, S, NH или NR¹², где R¹² представляет собой C₁-C₈алкил;

R¹¹ выбран из H, C₁-C₂₀ алкила, арила, C₃-C₈гетероцикла, -(R¹³O)_m-R¹⁴, или -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂; m представляет собой целое число в диапазоне 1-1000;

R¹³ представляет собой C₂-C₈алкил;

R¹⁴ представляет собой H или C₁-C₈алкил;

каждый встречающийся R¹⁵ независимо представляет собой H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂,

$-(CH_2)_n-SO_3H$ или $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ алкил;

каждый встречающийся R^{16} независимо представляет собой H, C_1-C_8 алкил или $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} выбран из $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арила, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ гетероцикла) и $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ карбоцикла); и

n представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 6.

В одном варианте осуществления, R^3 , R^4 и R^7 независимо представляют собой изопропил или втор-бутил и R^5 представляет собой -H или метил. В иллюстративном варианте осуществления, каждый из R^3 и R^4 представляет собой изопропил, R^5 представляет собой -H, и R^7 представляет собой втор-бутил.

В другом варианте осуществления, каждый из R^2 и R^6 представляет собой метил, и R^9 представляет собой -H.

В другом варианте осуществления, каждый встречающийся R^8 представляет собой $-OCH_3$.

В иллюстративном варианте осуществления, каждый из R^3 и R^4 представляет собой изопропил, каждый из R^2 и R^6 представляет собой метил, R^5 представляет собой -H, R^7 представляет собой втор-бутил, каждый встречающийся R^8 представляет собой $-OCH_3$, и R^9 представляет собой -H.

В одном варианте осуществления, Z представляет собой -O- или -NH-.

В одном варианте осуществления, R^{10} представляет собой арил.

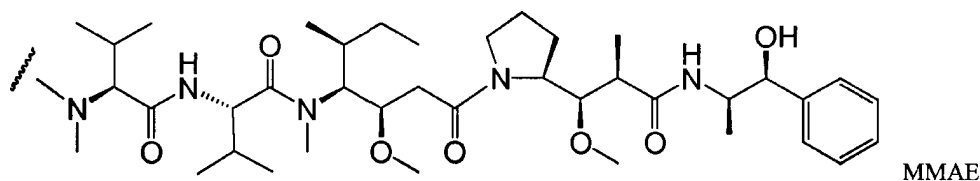
В иллюстративном варианте осуществления, R^{10} представляет собой -фенил.

В иллюстративном варианте осуществления, когда Z представляет собой -O-, R^{11} представляет собой -H, метил или трет-бутил.

В одном варианте осуществления, когда Z представляет собой -NH-, R^{11} представляет собой $-CH(R^{15})_2$, где R^{15} представляет собой $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, и R^{16} представляет собой $-C_1-C_8$ алкил или $-(CH_2)_n-COOH$.

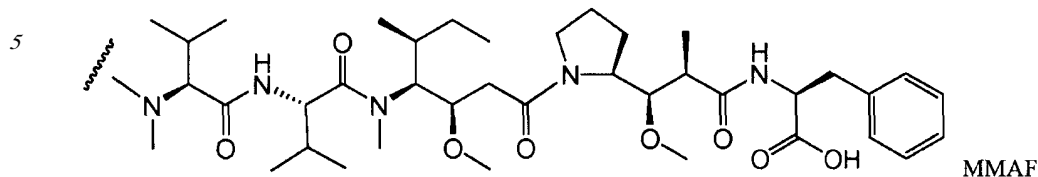
В другом варианте осуществления, когда Z представляет собой -NH-, R^{11} представляет собой $-CH(R^{15})_2$, где R^{15} представляет собой $-(CH_2)_n-SO_3H$.

Иллюстративный вариант осуществления ауристатина формулы D_E представляет собой MMAE, где волнистой линией указано ковалентное присоединение к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство:



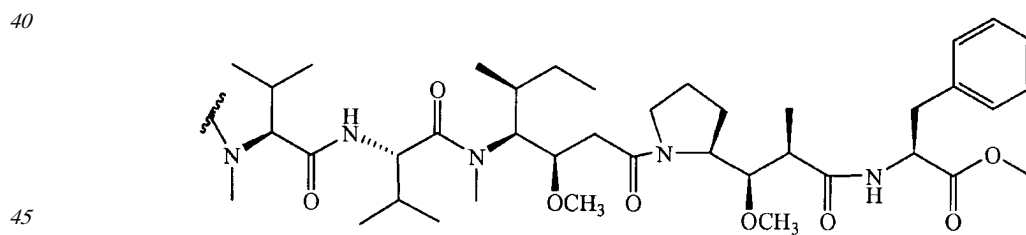
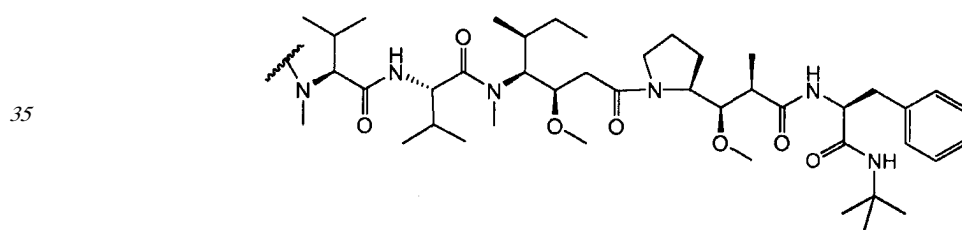
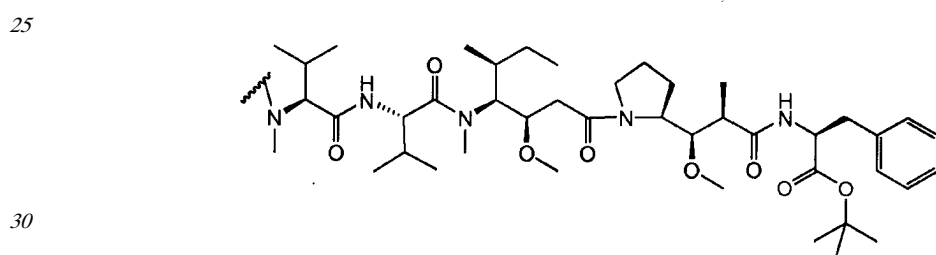
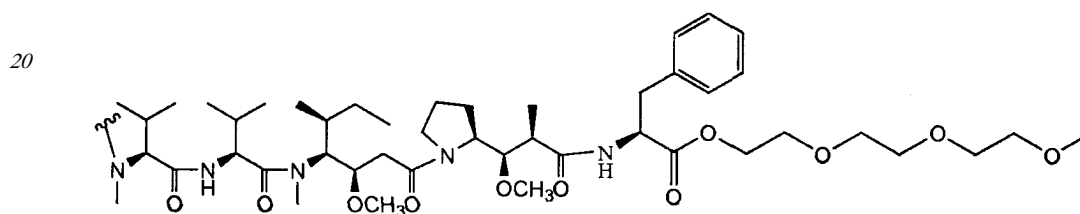
Иллюстративный вариант осуществления ауристатина формулы D_F представляет

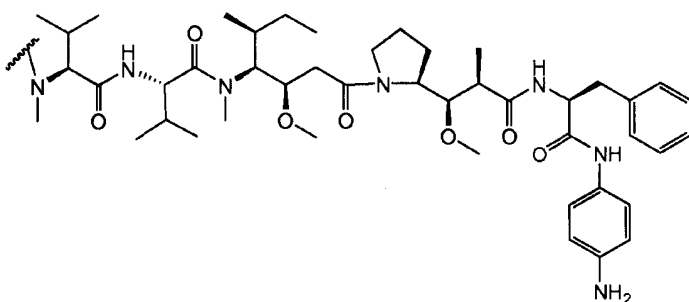
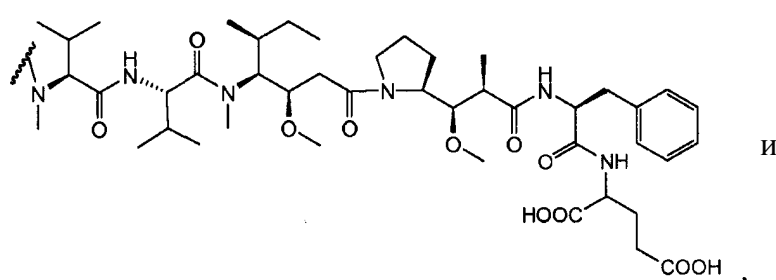
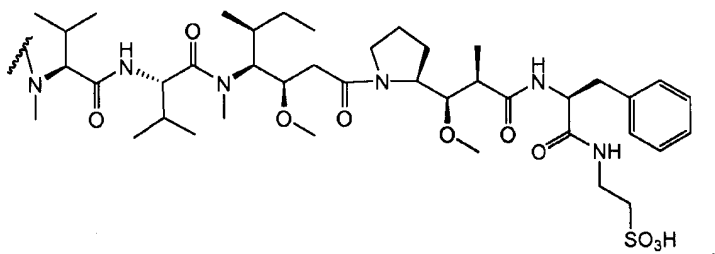
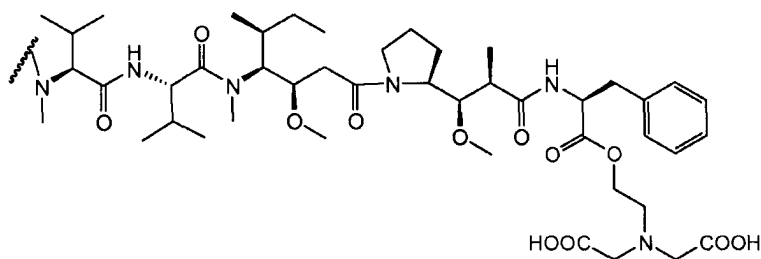
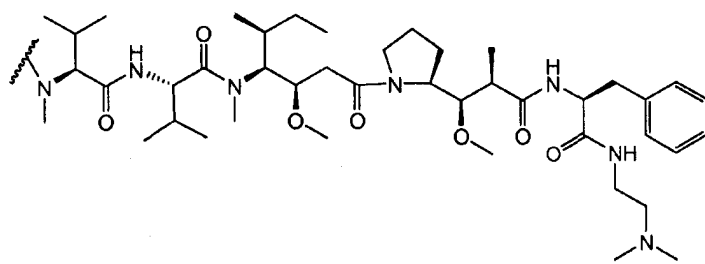
с собой MMAF, где волнистой линией указано ковалентное присоединение к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство (см. US 2005/0238649 и Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124):



10 Другие иллюстративные варианты осуществления включают соединения монометилвалина, имеющие карбокси-модификации фенилаланина на С-конце пентапептидной группы лекарственного средства в виде ауристатина (WO 2007/008848), и соединения монометилвалина, имеющие модификации боковой цепи фенилаланина на С-конце пентапептидной группы лекарственного средства в виде ауристатина (WO

15 2007/008603).
Другие группы лекарственного средства включают следующие производные MMAF, где волнистой линией указано ковалентное присоединение к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство:

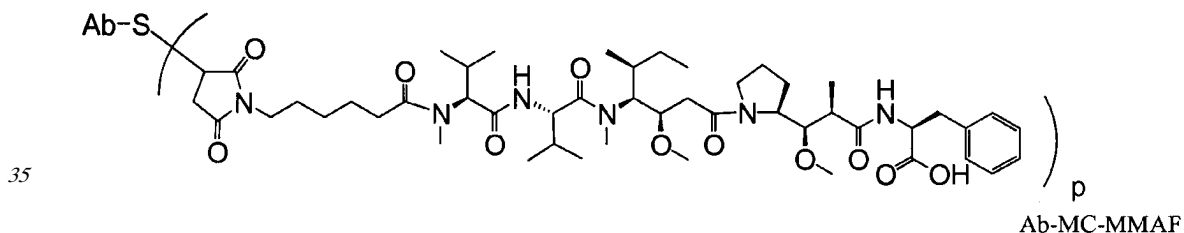
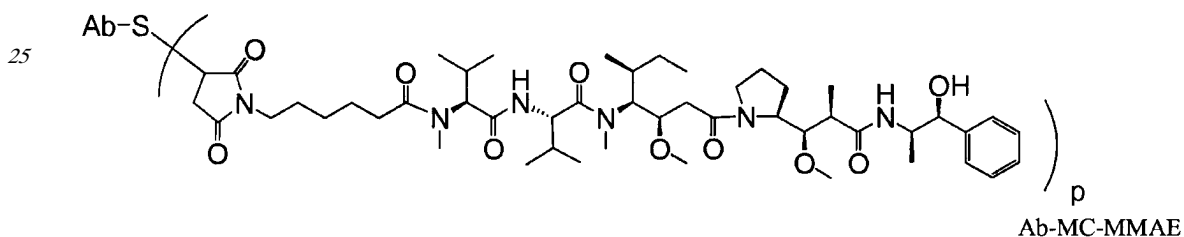
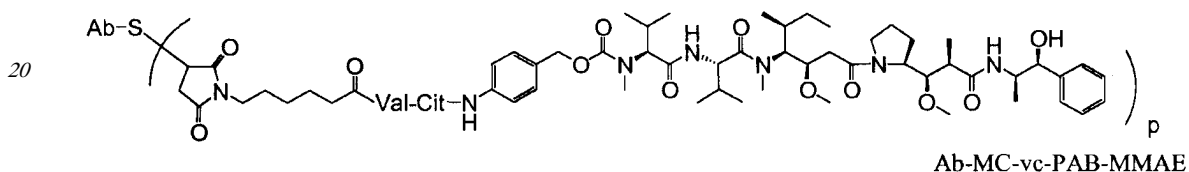
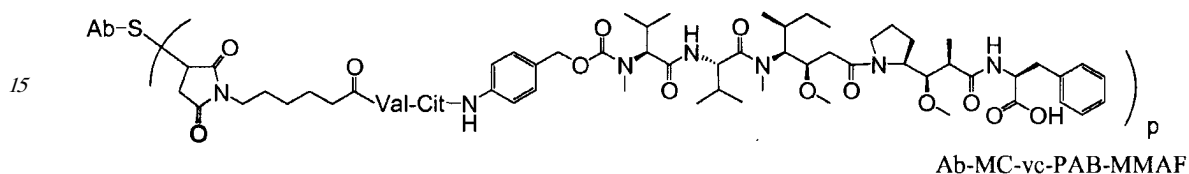




В одном аспекте, с группой лекарственного средства можно связывать гидрофильные группы, включая, но не ограничиваясь ими, сложные эфиры триэтиленгликоля (TEG), как показано выше, в R¹¹. Без связи с какой-либо конкретной теорией, гидрофильные группы способствуют интернализации и препятствуют агрегации группы лекарственного средства.

Иллюстративные варианты осуществления ADC формулы I, содержащих ауристатин/доластатин или их производное, описаны в US 2005-0238649 и Doronina et al. (2006)

Bioconjugate Chem. 17, 114-124, которые включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме. Иллюстративные варианты осуществления ADC формулы I, содержащих MMAE или MMAF и различные линкерные компоненты, имеют следующие структуры и сокращения (где "Ab" представляет собой антитело, p равно от 1 до 5 приблизительно 8, "Val-Cit" или "vc" представляет собой дипептид валин-цитруллин, и "S" представляет собой атом серы. Следует отметить, что в определенных описаниях структуры связанного через серу ADC в настоящем документе, антитело представлено как "Ab-S", только для того, чтобы указать на признак наличия связи через серу, но не для того, чтобы указать на то, что конкретный атом серы несет несколько групп линкер-лекарственное средство. Левая скобка в представленных ниже структурах также может быть помещена слева от атома серы, между Ab и S, что является эквивалентным описанием ADC по изобретению, описанного в настоящем документе.



Иллюстративные варианты осуществления ADC формулы I, содержащих MMAF и различные линкерные компоненты, включают Ab-MC-PAB-MMAF и Ab-PAB-MMAF. Интересно, что, как было показано, иммуноконъюгаты, содержащие MMAF, связанный с антителом через линкер, который не является протеолитически отщепляемым, обладают активностью, сравнимой с иммуноконъюгатами, содержащими MMAF, связанный с антителом посредством протеолитически отщепляемого линкера. См., Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124. В таких случаях, полагают, что высвобождение лекарственного средства обеспечивается деградацией антитела в клетке. Там же.

Как правило, группы лекарственного средства на основе пептидов можно получать образованием пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи можно получать, например, способом

жидкостного синтеза (см. E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Группы лекарственного средства в виде ауристатина/доластатина можно получать согласно способам: US 2005-0238649 A1; патента США No.5635483; патента США No.5780588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; и Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784.

В частности, группы лекарственного средства в виде ауристатина/доластатина формулы D_F, такие как MMAF и его производные, можно получать с использованием способов, описанных в US 2005-0238649 A1 и Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124. Группы лекарственного средства в виде ауристатина/доластатина формулы D_E, такие как MMAE и его производные, можно получать с использованием способов, описанных в Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784. Группы лекарственное средство-линкер MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, и MC-vc-PAB-MMAE можно удобным образом синтезировать общепринятыми способами, например, как описано в Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784, и публикации патентной заявки No. US 2005/0238649 A1, а затем конъюгировать с представляющим интерес антителом.

(3) Калихеамицин

В других вариантах осуществления, иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Антибиотики семейства калихеамицина способны образовывать двухцепочечные разрывы ДНК при субпикомолярных концентрациях. Для получения конъюгатов семейства калихеамицина, см. патенты США No. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все выданы American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-ацетил- γ_1^I , PSAG и θ_1^I (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) и упомянутые выше патенты США, выданные American Cyanamid). Другим противоопухолевым лекарственным средством, с которым можно конъюгировать антитело, является QFA, который представляет собой антифолат. Как калихеамицин, так и QFA, обладают внутриклеточным действием, и они не легко проходят через плазматическую мембрану. Таким образом, клеточный захват этих веществ посредством опосредуемой антителом интернализации значительно повышает их цитотоксические эффекты.

с. Другие цитотоксические средства

Другие противоопухолевые средства, которые можно конъюгировать с антителом, включают BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил, семейство средств, совокупно известных как комплекс LL-E33288, описанный в патентах США No. 5053394, 5770710, а также эсперамицины (патент США No. 5877296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки-диантаны, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованный 28 октября, 1993.

Кроме того, настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату, образованному

между антителом и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или эндонуклеазой ДНК, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

В определенных вариантах осуществления, иммуноконъюгат может содержать радиоактивный атом. Для продукции радиоактивных конъюгированных антител доступны различные радиоактивные изотопы. Их примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. В случае применения иммуноконъюгата для детекции, он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например $\text{tc}^{99\text{m}}$ или I^{123} , или спиновую метку для получения изображения ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как также йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиоактивные или другие метки можно встраивать в конъюгат известными способами. Например, пептид может быть биологически синтезированным или его можно синтезировать посредством химического синтеза аминокислот с использованием подходящих предшественников аминокислот, включающих, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как $\text{tc}^{99\text{m}}$ или I^{123} , Re^{186} , Re^{188} и In^{111} можно присоединять через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 можно присоединять через остаток лизина. Способ с IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) можно использовать для встраивания йода-123. В "Monoclonal Antibodies in Immunosciintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) подробно описаны другие способы.

В определенных вариантах осуществления, иммуноконъюгат может содержать антитело, конъюгированное с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидильное химиотерапевтическое средство, см. WO 81/01145) в активное лекарственное средство, такое как лекарственное средство против злокачественной опухоли. Такие иммуноконъюгаты пригодны в антителозависимой опосредуемой ферментом терапии пролекарством ("ADEPT"). Ферменты, которые можно конъюгировать с антителом, включают, но не ограничиваются ими, щелочные фосфатазы, которые пригодны для превращения содержащих фосфат пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазы, которые пригодны для превращения содержащих сульфат пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминазу, которая пригодна для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в лекарственное средство против злокачественной опухоли, 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза *Serratia*, термоллизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые пригодны для превращения содержащих пептид пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, которые пригодны для превращения пролекарств, которые содержат заместители в виде D-аминокислот; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, которые пригодны для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β -лактамаза, которая пригодна для превращения лекарственных средств, преобразованных в производное с β -лактамами в свободные лекарственные средства; и пенициллинамидазы, такие как амидаза пенициллина V и амидаза пенициллина G, которые пригодны для превращения лекарственных средств, преобразованных в производные по их атомам азота аминогрупп с помощью феноксиацетильной или фенилацетильной групп, соответственно, в свободные лекарственные средства. Ферменты можно ковалентно связывать с антителами способами рекомбинантных ДНК, хорошо известными в данной области. См., например, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984).

d. Нагрузка лекарственным средством

Нагрузке лекарственным средством соответствует p , среднее число групп лекарственного средства на антитело в молекуле формулы I. Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 20 групп лекарственного средства (D) на антитело. ADC формулы I включают коллекции антител, конъюгированных с числом групп лекарственного средства в диапазоне от 1 до 20. Среднее число групп лекарственного средства на антитело в препаратах ADC после реакций конъюгаций может быть охарактеризовано общепринятыми способами, такими как масс-спектрометрия, анализ ELISA и ВЭЖХ. Количественное распределение ADC в значениях p также может быть определено. В некоторых случаях, разделение, очистку и охарактеризацию гомогенного ADC, где p представляет собой определенное значение для ADC с другой нагрузкой лекарственным средством, можно проводить способами, такими как обращено-фазовая ВЭЖХ или электрофорез. Фармацевтические составы конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы I, таким образом, могут представлять собой гетерогенную смесь таких конъюгатов, в которых антитела связаны с 1, 2, 3, 4 или более группами лекарственного средства.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство p может быть ограничено количеством участков на антителе. Например, когда связывание осуществляется через тиольную группу цистеина, в качестве иллюстративного варианта осуществления, представленного выше, антитело может иметь только одну или несколько тиольных групп цистеина, или оно может иметь только одну или несколько достаточно реакционно-способных тиольных групп, через которые может быть присоединен линкер. В определенных вариантах осуществления, более высокая нагрузка лекарственным средством, например $p > 5$, может приводить к агрегации, нерастворимости, токсичности или утрате способности проникать в клетки определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство. В определенных вариантах осуществления, нагрузка лекарственным средством для ADC по изобретению находится в диапазоне от 1 до приблизительно 8; от приблизительно 2 до приблизительно 6; или от приблизительно 3 до приблизительно 5. Действительно, было показано, что для определенных ADC оптимальное отношение групп лекарственного средства к антителу может составлять менее 8, и оно может составлять от приблизительно 2 до приблизительно 5. См. US 2005-0238649 A1.

В определенных вариантах осуществления, в ходе реакции конъюгации происходит конъюгация меньшего количества групп лекарственного средства, чем теоретическое количество. Антитело может содержать, например, остатки лизина, которые не реагируют с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, как рассмотрено ниже. Как правило, антитела не содержат множества свободных и реакционно-способных тиольных групп цистеина, которые могут быть связаны с группой лекарственного средства; действительно, большинство тиольных остатков цистеина в антителах существуют в качестве дисульфидных мостиков. В определенных вариантах осуществления, антитело можно восстанавливать восстановителем, таким как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в частично или полностью восстанавливающих условиях, для получения реакционно-способных тиольных групп цистеина. В определенных вариантах осуществления, антитело подвергают денатурирующим условиям для выявления реакционно-способных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Нагрузку (отношение лекарственное средство/антитело) ADC можно контролировать различными способами, например, путем: (i) ограничения молярного избытка

промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента относительно антитела, (ii) ограничения времени или температуры реакции конъюгации, и (iii) частичных или ограничивающих восстанавливающих условий для модификации тиольной группы цистеина.

5 Следует понимать, что когда более одной нуклеофильной группы реагирует с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, с последующей реакцией с реагентом лекарственного средства, тогда полученный продукт представляет собой смесь соединений ADC с одной или несколькими
10 распределенными группами лекарственного средства, связанными с антителом. Среднее число групп лекарственного средства на антитело в смеси можно вычислить с помощью двойного анализа ELISA с антителами, которые являются специфичными к антителу и специфичными к лекарственному средству. Отдельные молекулы ADC можно идентифицировать в смеси масс-спектрометрией и разделять посредством ВЭЖХ, например, хроматографии гидрофобного взаимодействия (см., например, McDonagh et al. (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7): 299-307; Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer
15 Res. 10:7063-7070; Hamblett, KJ., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S. C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Abstract No. 627, American Association for Cancer
20 Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). В определенных вариантах осуществления, из смеси конъюгатов можно выделять гомогенный ADC с одним значением нагрузки путем электрофореза или хроматографии.

25 **е. Некоторые способы получения иммуноконъюгатов**

ADC формулы I можно получать несколькими способами с использованием реакций, условий и реагентов органической химии, известных специалистам в данной области, включая: (1) реакцию нуклеофильной группы антитела с двухвалентным линкерным реагентом с образованием Ab-L через ковалентную связь, с последующей реакцией с
30 группой лекарственного средства D; и (2) реакцию нуклеофильной группы в группе лекарственного средства с двухвалентным линкерным реагентом, с образованием D-L, через ковалентную связь, с последующей реакцией с нуклеофильной группой антитела. Иллюстративные способы получения ADC формулы I последним способом описаны в US 2005-0238649 A1, который включен в настоящий документ в качестве ссылки в
35 полном объеме.

Нуклеофильные группы на антителах включают, но не ограничиваются ими: (i) N-концевые аминогруппы, (ii) аминогруппы боковых цепей, например, лизина, (iii) тиольные группы боковых цепей, например, цистеина, и (iv) гидроксилы или
40 аминогруппы сахаров, где антитело является гликозилированным. Амино, тиольная и гидроксильная группы являются нуклеофильными и способны вступать в реакцию с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных группах и линкерных реагентах, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBt, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) группы альдегидов, кетонов,
45 карбоксильные и малеимидные группы. Определенные антитела обладают поддающимися восстановлению дисульфидами между цепями, т.е. цистеиновыми мостиками. Реакционную способность антитела для конъюгации с линкерными реагентами можно обеспечивать посредством обработки восстановителем, таким как

ДТТ (дитиотреитол) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), так чтобы антитело полностью или частично восстанавливалось. Каждый цистеиновый мостик, таким образом, может образовывать, теоретически, два реакционно-способных тиольных нуклеофила.

Дополнительные нуклеофильные группы можно вносить в антитела посредством модификации остатков лизина, например, реакцией остатков лизина с 2-иминотиоланом (реакгентом Трота), приводящей к превращению амина в тиол. Реакционно-способные тиольные группы можно вносить в антитело путем встраивания одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, путем получения вариантов антител, содержащих один или несколько ненативных аминокислотных остатка цистеина).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению также можно получать реакцией между электрофильной группой на антителе, такой как карбонильная группа альдегида или кетона, с нуклеофильной группой на линкерном реагенте или лекарственном средстве. Подходящие нуклеофильные группы на линкерном реагенте включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, амино, гидразин,

тиосемикарбазон, гидразина карбоксилат и арилгидразид. В одном варианте осуществления, антитело модифицируют внесением электрофильных групп, которые способны реагировать с нуклеофильными заместителями на линкерном реагенте или лекарственном средстве. В другом варианте осуществления, сахара гликозилированных антител можно окислять, например, окисляющими реагентами на основе перйодатов, с образованием групп альдегидов или кетонов, которые могут реагировать с аминокислотной группой линкерных реагентов или групп лекарственного средства. Полученные иминокислоты основания Шиффа могут образовывать стабильную связь, или их можно восстанавливать, например, боргидридными реагентами, с образованием стабильных связей через амин. В одном варианте осуществления, реакция углеводной части гликозилированного антитела либо с галактозооксидазой, либо с метаперйодатом натрия, может приводить к карбонильным группам (группам альдегидов и кетонов) в антителе, которые могут вступать в реакции с соответствующими группами на лекарственном средстве (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте осуществления, антитела, содержащие N-концевые остатки серина или треонина могут реагировать с метаперйодатом натрия, что приводит к образованию альдегида вместо первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Такой альдегид можно подвергать реакции с группой лекарственного средства или нуклеофилом линкера.

Нуклеофильные группы на группе лекарственного средства включают, но не ограничиваются ими: аминокислотную, тиольную, гидроксильную группы, группы гидразида, оксима, гидразина, тиосемикарбазона, гидразина карбоксилата и арилгидразида, способные вступать в реакции с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных группах и линкерных реагентах, включающих: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBT, галоформилаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенациетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы.

Соединения по изобретению полностью предусматривают, но не ограничиваются ими, ADC, полученные со следующими поперечно-сшивающими реагентами: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфид-EMCS, сульфид-GMBS, сульфид-KMUS, сульфид-MBS, сульфид-SIAB, сульфид-SMCC и сульфид-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.; см. страницы 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog).

Иммуноконъюгаты, содержащие антитело и цитотоксическое средство, также можно получать с использованием различных бифункциональных средств для присоединения белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (ИТ), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола), и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO94/11026.

Альтернативно слитый белок, содержащий антитело и цитотоксическое средство, можно получать, например, рекомбинантными способами или пептидным синтезом. Рекомбинантная молекула ДНК может содержать участки, кодирующие часть антитела и часть цитотоксического средства конъюгата, либо расположенные рядом друг с другом, либо разделенные участком, кодирующим линкерный пептид, который не нарушает требуемые свойства конъюгата. В другом варианте осуществления, антитело можно конъюгировать с "рецептором" (таким как стрептавидин) для применения в предварительном нацеливании на опухоль, где конъюгат антитело-рецептор вводят пациенту, с последующим удалением не связавшегося конъюгата из кровотока с использованием средства для выведения, а затем введением "лиганда" (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим средством (например, радионуклидом).

Иллюстративные иммуноконъюгаты - конъюгаты тио-антитело-лекарственное средство

а. Получение антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина

ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность варианта антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина и исходных антител против CD79b по изобретению, получают различными способами, которые включают, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности), получение с помощью сайт-направленного (или олигонуклеотид-опосредуемого) мутагенеза (Carter (1985) et al. Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443; Ho et al. (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260), мутагенез посредством ПЦР (Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito et al. (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; и Valletta et al. (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733), и каскадный мутагенез (Wells et al. (1985) Gene 34:315-323) ранее полученной ДНК, кодирующей полипептид. Протоколы мутагенеза, наборы и реагенты являются коммерчески доступными, например, QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Единичные мутации также вносят путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием двухцепочечной плазмидной ДНК в качестве матрицы с помощью мутагенеза на основе ПЦР (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al. (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500). Варианты рекомбинантных антител также можно конструировать путем

манипуляции с ферментами рестрикции или посредством ПЦР с перекрывающимся удлинением с синтетическими олигонуклеотидами. Мутагенные праймеры кодируют кодон цистеина для замены(замен). Для получения ДНК, кодирующей такие мутантные антитела со встроенными в них остатками цистеина, можно использовать способы мутагенеза (Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; и Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing и Wiley-Interscience, New York, N. Y., 1993).

Для получения антител человека против CD79b и фрагментов антител *in vitro*, из наборов генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов неиммунизированных доноров можно использовать технологию фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)). В соответствии с этим способом, гены V домена антител клонируют в рамке считывания либо главного, либо второстепенного гена оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и они экспонируются в качестве функциональных фрагментов антител на поверхности частицы фага. Вследствие того, что нитевидная частица содержит одноцепочечную копию ДНК генома фага, селекция на основе функциональных свойств антитела также приведет к селекции гена, кодирующего антитело, проявляющее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые из свойств В-клетки (Johnson et al. (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571; Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith et al. (1993) EMBO J. 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

Антитела против CD79b можно химически синтезировать с использованием известных способов синтеза олигопептидов или их можно получать и очищать с использованием рекомбинантной технологии. Соответствующую аминокислотную последовательность, или ее части, можно получать путем прямого пептидного синтеза с использованием твердофазных способов (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc, 85:2149-2154). Синтез белка *in vitro* можно проводить с использованием способов или с помощью автоматизации. Автоматизированный твердофазный синтез можно проводить, например, с использованием защищенных посредством t-BOC или Fmoc аминокислот и с применением an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) с использованием инструкций изготовителя. Различные части антитела против CD79b или полипептида CD79b можно химически синтезировать по отдельности и объединять с использованием химических или ферментативных способов для получения требуемого антитела против CD79b или полипептида CD79b.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные способы. Традиционно, эти фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al. (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; и Brennan et al. (1985) Science, 229:81) или их можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител против CD79b могут быть экспрессированы и секретированы в *E. coli*, таким образом, обеспечивая простой способ получения больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, описанных выше. Альтернативно фрагменты Fab'-SH можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически связывать с получением фрагментов F(ab')₂ (Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:163-167), или их можно выделять непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Антитело против CD79b может представлять собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) (WO 93/16185; патент США No. 5571894; и патент США No. 5587458). Фрагмент антитела против CD79b также может представлять собой

"линейное антитело" (US 5641870). Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Представленное ниже описание относится, главным образом, к продукции антител против CD79b путем культивирования клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим кодирующую антитело против CD79b нуклеиновую кислоту. ДНК, кодирующую антитела против CD79b, можно получать из библиотеки кДНК, полученной из ткани, предположительно обладающей мРНК антитела против CD79b и экспрессирующей ее на поддающемся детекции уровне. Таким образом, ДНК антитела против CD79b человека или полипептида CD79b можно удобным образом получать из библиотеки кДНК, полученной из ткани человека. Ген, кодирующий антитело против CD79b, также можно получать из геномной библиотеки или известными способами синтеза (например, автоматизированным синтезом нуклеиновых кислот).

Способы конструирования, селекции и получения по изобретению обеспечивают антитела против CD79b со встроенными в них остатками цистеина, которые являются реакционно-способными к электрофильным функциональным группам. Кроме того, эти способы обеспечивают соединения конъюгатов антител, такие как соединения конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) с молекулами лекарственного средства в определенных, предусмотренных, селективных участках. Реакционно-способные остатки цистеина на поверхности антитела позволяют специфичную конъюгацию с группой лекарственного средства через тиольную реакционно-способную группу, такую как малеимид или галоацетил. Нуклеофильная реакционная способность тиольной функциональной группы остатка Cys к малеимидной группе приблизительно в 1000 раз превышает реакционную способность к любой другой функциональной группе аминокислоты в белке, такой как аминокислотная группа остатков лизина или N-концевая аминокислотная группа. Специфичная к тиольной группе функциональная группа в йодоацетильных и малеимидных реагентах может реагировать с аминокислотными группами, однако требуются более высокие значения pH (>9,0) и более длительное время реакции (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). Количество свободных тиольных групп в белке можно оценивать стандартным анализом Элмана. Иммуноглобулин М представляет собой один из примеров связанного дисульфидом пентамера, а иммуноглобулин G является примером белка с внутренними дисульфидными связями, связывающими субъединицы вместе. В белках, таких как эти, требуется восстановление дисульфидных связей таким реагентом, как дитиотреитол (DTT) или селенол (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304: 147-156) для образования реакционно-способной свободной тиольной группы. Этот подход может приводить к потере третичной структуры антитела и специфичности связывания антигена.

Анализ PHESELECTOR (фаговый ELISA для селекции реакционно-способных тиольных групп) позволяет детекцию реакционно-способных групп цистеина в антителах в фаговом формате ELISA, тем самым облегчая конструирование антител со встроенными в них остатками цистеина (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332: 41-52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). Антитело со встроенными в него остатками цистеина наносят на поверхности лунок с последующей инкубацией с фаговыми частицами, добавлением меченого HRP вторичного антитела и детекцией поглощения. Мутантные белки, экспонируемые на фаге, можно подвергать скринингу быстрым, надежным и высокопроизводительным образом. Можно получать библиотеки антител со встроенными в них остатками цистеина и подвергать их селекции связывания с использованием того же подхода для идентификации соответствующего включения

реакционно-способных участков свободного Cys в случайных фаговых белковых библиотеках антител или других белков. Этот способ включает реакцию мутантных белков с цистеином, экспонированных на фage, с аффинным реагентом или репортерной группой, которая также является реакционно-способной к тиольной группе.

Анализ RHESELECTOR позволяет скрининг реакционно-способных тиольных групп в антителах. Примером является идентификация варианта A121C этим способом. Можно проводить эффективный поиск по целой молекуле Fab в целях идентификации большего количества вариантов тiao-Fab с реакционно-способными тиольными группами. Для идентификации и количественного определения доступности растворителя к аминокислотным остаткам в полипептиде использовали параметр, представляющий собой относительную доступность поверхности. Доступность поверхности может быть выражена в площади поверхности ($\text{\AA}^2$), которая может контактировать с молекулой растворителя, например, воды. Пространство, занимаемое водой, составляет приблизительно сферу с радиусом 1,4 $\text{\AA}$. Свободно доступным или лицензируемым является программное обеспечение (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, или через интернет: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) в качестве пакета программ CCP4 Suite для кристаллографии, в котором используются алгоритмы для вычисления доступности поверхности каждой аминокислоты в белке с известными полученными рентгеновской кристаллографией координатами ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763). Два иллюстративных модуля программного обеспечения, которые проводят вычисления доступности поверхности, представляют собой "AREAIMOL" и "SURFACE", на основе алгоритмов B. Lee and F.M.Richards (1971) J.Mol. Biol. 55:379-400. AREAIMOL определяет доступную для растворителя поверхность белка в качестве местоположения зондовой сферы (соответствующей молекуле растворителя), по мере того, как она перекачивается по ван-дер-ваальсовой поверхности белка. AREAIMOL вычисляет площадь поверхности, доступную для растворителя, путем создания точек поверхности приблизительно на каждом атоме расширенной сферы (на расстоянии от центра атома, равном сумме радиусов атома и зонда), и устранением тех точек, которые лежат в эквивалентных сферах, ассоциированных с соседними атомами. AREAIMOL находит доступную для растворителя площадь атомов в файле координат PDB, и обобщает доступную площадь для остатка, цепи или целой молекулы. Доступные площади (или разности площадей) для отдельных атомов могут быть записаны в файл результатов pseudo-PDB. AREAIMOL предполагает один радиус для каждого элемента, и распознает только ограниченное число различных элементов.

AREAIMOL и SURFACE выдают абсолютную доступность, т.е. число квадратных Ангстрем ($\text{\AA}$). Относительную доступность поверхности вычисляют относительно стандартного состояния, соответствующего аминокислоте в полипептиде. Стандартное состояние представляет собой трипептид Gly-X-Gly, где X представляет собой представляющую интерес аминокислоту, и стандартное состояние должно представлять собой "удлиненную" конформацию, т.е. подобную конформации в бета-цепях. Удлиненная конформация максимизирует доступность X. Вычисленная доступная площадь делится на доступную площадь в стандартном состоянии трипептида Gly-X-Gly и предоставляется доля, которая представляет собой относительную доступность. Процентная доступность представляет собой относительную доступность, умноженную на 100. Другой иллюстративный алгоритм для вычисления доступности поверхности основан на модуле SOLV программы xsaе (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel), которая вычисляет относительную доступность аминокислотного остатка для сферы воды на

основе рентгеновских координат полипептида. Относительную доступность поверхности для каждой аминокислоты в антителе можно вычислять с использованием доступной информации о кристаллической структуре (Eigenbrot et al. (1993) J Mol. Biol. 229: 969-995).

5 ДНК, кодирующую антитела со встроенными в них остатками цистеина, легко выделять и секвенировать с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антител мыши). Клетки гибридомы служат в качестве источника такой ДНК. После выделения, ДНК можно помещать в
10 экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомяка (CHO), или другие клетки-хозяева млекопитающих, такие как клетки миеломы (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310), которые в ином случае не продуцируют белок антитела, обеспечивая синтез моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

15 После конструирования и селекции, антитела со встроенными в них остатками цистеина, например тимо-Fab, со встроенными в них высоко реакционно-способными неспаренными остатками Cys, можно получать "свободные остатки аминокислоты цистеина" путем: (i) экспрессии в бактериальной системе, например *E. coli* (Skerra et al. (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262; Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188)
20 или клеточной культуральной системе млекопитающих (WO 01/00245), например, в клетках яичника китайского хомяка (CHO); и (ii) очистки с использованием общепринятых способов очистки белков (Lowman et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988).

Встроенные тиольные группы Cys реагируют с электрофильными линкерными
25 реагентами и промежуточными соединениями лекарственное средство-линкер с образованием конъюгатов антитела со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства и других меченных антител со встроенными в них остатками цистеина. Остатки Cys в антителах со встроенными в них остатками цистеина, и остатки Cys, присутствующие в исходных антителах, которые образуют пары и образуют
30 межцепочечные и внутрицепочечные дисульфидные связи, не обладают какими-либо реакционно-способными тиольными группами (пока их не обработать восстановителем) и не реагируют с электрофильными линкерными реагентами или промежуточными соединениями лекарственное средство-линкер. Вновь встроенный остаток Cys, может оставаться неспаренным, и способен реагировать, т.е. образовывать конъюгат, с
35 электрофильным линкерным реагентом или промежуточным соединением лекарственное средство-линкер, таким как лекарственное средство-малеимид. Иллюстративные промежуточные соединения лекарственное средство-линкер включают: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAV-MMAE и MC-vc-PAV-MMAF. Структурные положения встроенных остатков Cys тяжелой и легкой цепей пронумерованы согласно системе
40 нумерации по последовательности. Эта система нумерации по последовательности коррелирует с системой нумерации Кабат (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), начиная с N-конца, и отличается от системы нумерации Кабат (нижний ряд) вставками, указанными посредством a, b, c. С использованием системы нумерации Кабат, истинная линейная
45 аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или CDR варибельного домена. Измененные участки тяжелой цепи со встроенными остатками цистеина указаны с помощью схем нумерации по последовательности и

нумерации по Кабат.

В одном варианте осуществления, антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина получено путем процесса, включающего:

(a) замену одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела против CD79b цистеином; и

(b) определение реакционной способности тиольной группы в антителе против CD79b со встроенными в него остатками цистеина путем реакции антитела со встроенными в него остатками цистеина с реакционно-способным к тиольной группе реагентом.

Антитело со встроенными в него остатками цистеина может быть более реакционно-способным, чем исходное антитело, к реакционно-способному к тиольной группе реагенту.

Свободные аминокислотные остатки цистеина могут быть расположены в тяжелой или легкой цепях, или в константных или переменных доменах. Фрагменты антител, например Fab, также можно конструировать с одной или несколькими аминокислотами цистеина, заменяющими аминокислоты фрагмента антитела, с образованием фрагментов антител со встроенными в них остатками цистеина.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу получения (изготовления) антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина, включающему:

(a) встраивание одного или нескольких остатков аминокислоты цистеина в исходное антитело против CD79b для получения антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина; и

(b) определение реакционной способности тиольной группы в антителе со встроенными в него остатками цистеина к реакционно-способному к тиольной группе реагенту;

где антитело со встроенными в него остатками цистеина является более реакционно-способным, чем исходное антитело с реакционно-способным к тиольной группе реагентом.

Стадия (a) способа получения антитела со встроенными в него остатками цистеина может включать:

(i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело со встроенными в него остатками цистеина;

(ii) экспрессию антитела со встроенными в него остатками цистеина; и

(iii) выделение и очистку антитела со встроенными в него остатками цистеина.

Стадия (b) способа получения антитела со встроенными в него остатками цистеина может включать экспрессию антитела со встроенными в него остатками цистеина на вирусной частице, выбранной из фаговой или фагмидной частицы.

Стадия (b) способа получения антитела со встроенными в него остатками цистеина также может включать:

(i) реакцию антитела со встроенными в него остатками цистеина с реакционно-способным к тиольной группе аффинным реагентом с получением аффинно меченого антитела со встроенными в него остатками цистеина; и

(ii) измерение связывания аффинно меченого антитела со встроенными в него остатками цистеина с улавливающим носителем.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу скрининга антител со встроенными в них остатками цистеина с высоко реакционно-способными неспаренными аминокислотами цистеина в отношении реакционной способности тиольной группы, включающему:

(a) встраивание одного или нескольких остатков аминокислоты цистеина в исходное антитело для получения антитела со встроенными в него остатками цистеина;

(b) реакцию антитела со встроенными в него остатками цистеина с реакционно-способным к тиольной группе аффинным реагентом с образованием аффинно меченного антитела со встроенными в него остатками цистеина; и

(c) измерение связывания аффинно меченного антитела со встроенными в него остатками цистеина с улавливающим носителем; и

(d) определение реакционной способности тиольной группы в антителе со встроенными в него остатками цистеина к реакционно-способному к тиольной группе реагенту.

Стадия (a) способа скрининга антител со встроенными в них остатками цистеина может включать:

(i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело со встроенными в него остатками цистеина;

(ii) экспрессию антитела со встроенными в него остатками цистеина; и

(iii) выделение и очистку антитела со встроенными в него остатками цистеина.

Стадия (b) способа получения антитела со встроенными в него остатками цистеина может включать экспрессию антитела со встроенными в него остатками цистеина на вирусной частице, выбранной из фаговой или фагмидной частицы.

Стадия (b) способа получения антитела со встроенными в него остатками цистеина также может включать:

(i) реакцию антитела со встроенными в него остатками цистеина с реакционно-способным к тиольной группе аффинным реагентом с получением аффинно меченного антитела со встроенными в него остатками цистеина; и

(ii) измерение связывания аффинно меченного антитела со встроенными в него остатками цистеина с улавливающим носителем.

b. Варианты IgG против CD79b со встроенными в него остатками цистеина

Цистеин встраивали в участок 118 тяжелой цепи (нумерация EU) (эквивалентный положению 118 в тяжелой цепи, нумерация по последовательности) интактных химерных исходных моноклональных антител против CD79b или в участок 205 легкой цепи (нумерация по Кабат) (эквивалентный положению 210 в легкой цепи, нумерация по последовательности) интактных химерных исходных моноклональных антител против CD79b способами встраивания цистеина, описанными в настоящем документе.

Полученные антитела со встроенными в них остатками цистеина с цистеином в положении 118 тяжелой цепи (нумерация EU) представляли собой: (a) thio-hu2F2.D7-NC (A118C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO:85) и последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO:86), фигура 17.

Полученные антитела со встроенными в них остатками цистеина с цистеином в положении 205 легкой цепи (нумерация по Кабат) представляли собой: (a) thio-hu2F2.D7-LC (V205C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO:87) и последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO:88), фигура 18.

Эти моноклональные антитела со встроенными в них остатками цистеина экспрессировали в клетках CHO (яичника китайского хомяка) путем временной ферментации в среде, содержащей 1 mM цистеин.

Согласно одному варианту осуществления, гуманизированные антитела 2F2 против CD79b со встроенными в них остатками цистеина содержат одну или несколько из следующих последовательностей тяжелой цепи со свободным остатком аминокислоты цистеина (SEQ ID NO:91-99, таблица 2).

Таблица 2:
Сравнение нумерации тяжелой цепи по последовательности, по Кабат и по EU для вариантов гуманизированного антитела 2F2 против CD79b со встроенными в него остатками цистеина

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	НУМЕРАЦИЯ ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	НУМЕРАЦИЯ ПО Кабат	НУМЕРАЦИЯ EU	SEQ ID NO:
EVQLCESGGG	V5C	V5C		91
LRLSCCASYT	A23C	A23C		92
MNSLRCEDTAV	A88C	A84C		93
TLVTVCSASTK	S112C	S112C		94
VTVSSCSTKGP	A114C	A114C	A118C	95
VSSASCGPSV	T116C	T116C	T120C	96
WYVDGCEVHNA	V278C	V278C	V282C	97
KGFYPCDIAVE	S371C	S371C	S375C	98
PPVLDCDGSFF	S396C	S396C	S400C	99

Согласно одному варианту осуществления, химерные антитела 2F2 против CD79b со встроенными в них остатками цистеина содержат одну или несколько из следующих последовательностей тяжелой цепи со свободным остатком аминокислоты цистеина (SEQ ID NO:100-108, таблица 3).

Таблица 3:
Сравнение нумерации тяжелой цепи по последовательности, по Кабат и по EU для вариантов антитела ch2F2 против CD79b со встроенными в него остатками цистеина

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	НУМЕРАЦИЯ ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	НУМЕРАЦИЯ ПО КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU	SEQ ID NO:
QVQLCQPGAE	Q5C	Q5C		100
VKLSCCASYT	K23C	K23C		101
LSSLTCEDSAV	S88C	S84C		102
TSVTVCLASTK	S112C	S112C		103
VTVSSCSTKGP	A114C	A114C	A118C	104
VSSASCGPSV	T116C	T116C	T120C	105
WYVDGCEVHNA	V278C	V278C	V282C	106
KGFYPCDIAVE	S371C	S371C	S375C	107
PPVLDCDGSFF	S396C	S396C	S400C	108

Согласно одному варианту осуществления, гуманизированные антитела 2F2 против CD79b со встроенными в них остатками цистеина содержат одну или несколько из следующих последовательностей легкой цепи со свободным остатком аминокислоты цистеина (SEQ ID NO:109-115, таблица 4).

Таблица 4:
Сравнение нумерации легкой цепи по последовательности и по Кабат для вариантов гуманизированного антитела 2F2 против CD79b со встроенными в него остатками цистеина

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	НУМЕРАЦИЯ ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	НУМЕРАЦИЯ ПО КАБАТ	SEQ ID NO:
SLSASCGRVT	V15C	V15C	109
EIKRTCAAPSV	V115C	V110C	110
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	111
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	112
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	113
VTEQDCKDSTY	S173C	S168C	114
GLSSPCTKSFN	V210C	V205C	115

Согласно одному варианту осуществления, химерные антитела 2F2 против CD79b со встроенными в них остатками цистеина содержат одну или несколько из следующих последовательностей легкой цепи со свободным остатком аминокислоты цистеина (SEQ ID NO:116-122, таблица 5).

Таблица 5:
Сравнение нумерации легкой цепи по последовательности и по Кабат для вариантов антитела 2F2 против CD79b со встроенными в него остатками цистеина

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	НУМЕРАЦИЯ ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	НУМЕРАЦИЯ ПО КАБАТ	SEQ ID NO:
TLSVTCGQPAS	I15C	I15C	116
EIKRTCAAPSV	V115C	V110C	117
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	118
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	119
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	120
VTEQDCCKDSTY	S173C	S168C	121
GLSSPCTKSFN	V210C	V205C	122

с. Меченые антитела против CD79b со встроенными в них остатками цистеина

Антитела против CD79b со встроенными в них остатками цистеина по изобретению можно сайт-специфично и эффективно связывать с реакционно-способным к тиольной группе реагентом. Реакционно-способный к тиольной группе реагент может представлять собой многофункциональный линкерный реагент, реагент метки для улавливания, т.е. меченый реагент (например, реагент биотин-линкер), поддающуюся детекции метку (например, реагент флуорофора), реагент для твердофазной иммобилизации (например, SEPHAROSETM, полистирол или стекло), или промежуточное соединение лекарственное средство-линкер. Одним примером реакционно-способного к тиольной группе реагента является N-этилмалеимид (NEM). В иллюстративном варианте осуществления, реакция тио-Fab с реагентом биотин-линкер приводит к биотинилированному тио-Fab, по которому можно проводить детекцию наличия и измерение реакционной способности встроенного остатка цистеина. Реакция тио-Fab с многофункциональным линкерным реагентом приводит к тио-Fab с функционализированным линкером, который можно далее подвергать реакции с реагентом группы лекарственного средства или другой меткой. Реакция тио-Fab с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер приводит к конъюгату тио-Fab и лекарственного средства.

Иллюстративные способы, описанные в настоящем документе, можно применять, главным образом, для идентификации и продукции антител, и, в более общем смысле, других белков с использованием стадий конструирования и скрининга, описанных в настоящем документе.

Такой подход можно применять для конъюгации других реакционно-способных к тиольной группе реагентов, в которых реакционно-способная группа представляет собой, например, малеимид, йодоацетамид, пиридилдисульфид или другой реакционно-способный к тиольной группе партнер для конъюгации (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). Реакционно-способный к тиольной группе реагент может представлять собой группу лекарственного средства, флуорофор, такой как флуоресцентный краситель, такой как флуоресцеин или родамин, хелатирующий агент для визуализации или металл для лучевой терапии, пептидильную или непептидильную метку или поддающуюся детекции метку, или модифицирующее выведение средство, такое как различные изомеры полиэтиленгликоля, пептид, который связывается с третьим компонентом, или другое углеводное или липофильное средство.

d. Применение антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина

Антитела против CD79b со встроенными в них остатками цистеина и их конъюгаты можно применять в качестве терапевтических и/или диагностических средств. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам профилактики, управления течением,

лечения или смягчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных со связанным с В-клетками нарушением. В частности, настоящее изобретение относится к способам профилактики, управления течением, лечения или смягчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с клеточно-пролиферативным нарушением, таким как злокачественная опухоль, например, лимфома, неходжкинская лимфома (NHL), агрессивная NHL, рецидивирующая агрессивная NHL, рецидивирующая вялотекущая NHL, рефрактерная NHL, рефрактерная вялотекущая NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), и лимфома из клеток мантийной зоны. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам диагностики связанного с CD79b нарушения или предрасположенности к развитию такого нарушения, а также к способам идентификации антител и антиген-связывающих фрагментов антител, которые предпочтительно связывают ассоциированные с В-клетками полипептиды CD79b.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина для получения лекарственного средства, подходящего для лечения состояния, которое ответственно за связанное с В-клетками нарушение.

е. Конъюгаты антитела со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства (конъюгаты тиио-антитело-лекарственное средство (TDC))

Другой аспект изобретения представляет собой соединение конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащее антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина (Ab), и группу лекарственного средства ауристатина (D), где антитело со встроенными в него остатками цистеина связано через один или несколько свободных остатков аминокислоты цистеина линкерной группой (L) с D; причем соединение имеет формулу I:



где p равно 1, 2, 3, или 4; и где антитело со встроенными в него остатками цистеина получено путем процесса, включающего замену одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела против CD79b одним или несколькими свободными остатками аминокислоты цистеина.

Другой аспект изобретения относится к композиции, содержащей смесь соединений антитело-лекарственное средство формулы I, где средняя нагрузка лекарственным средством на антитело составляет от приблизительно 2 до приблизительно 5, или от приблизительно 3 до приблизительно 4.

На фигурах 17-18 представлены варианты осуществления конъюгатов антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства (ADC), где группа лекарственного средства, представляющего собой ауристатин, связана со встроенной группой цистеина в: легкой цепи (LC-ADC) или тяжелой цепи (HC-ADC).

Потенциальные преимущества конъюгатов антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства включают повышенную безопасность (более высокий терапевтический индекс), улучшенные параметры PK, сохранение внутрицепочечных дисульфидных связей антитела, которые могут стабилизировать конъюгат и сохранять его активную связывающую конформацию, определенные участки конъюгации лекарственного средства, и то, что получение конъюгатов антитела со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства путем конъюгации антитела со встроенными в них остатками цистеина с

реагентами лекарственное средство-линкер приводит к более гомогенному продукту.

Линкеры

"Линкер", "Линкерный элемент" или "соединение" означает химическую группу, содержащую ковалентную связь или цепь из атомов, которые ковалентно связывают антитело с группой лекарственного средства. В различных вариантах осуществления, линкер обозначают как L. "Линкер" (L) представляет собой бифункциональную или многофункциональную группу, которую можно использовать для связывания одной или нескольких групп лекарственного средства (D) и элемента антитела (Ab) с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) формулы I.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) можно удобным образом получать с использованием линкера, имеющего реакционно-способную функциональную группу для связывания с лекарственным средством и с антителом. Тиольная группа цистеина в антителе со встроенными в него остатками цистеина (Ab) может образовывать связь с электрофильной функциональной группой линкерного реагента, группой лекарственного средства или промежуточным соединением лекарственное средство-линкер.

В одном аспекте линкер обладает реакционно-способным участком, который обладает электрофильной группой, которая является реакционно-способной к нуклеофильному цистеину, присутствующему в антителе. Тиольная группа цистеина в антителе является реакционно-способной к электрофильной группе на линкере и образует ковалентную связь с линкером. Подходящие электрофильные группы включают, но не ограничиваются ими, малеимидную и галоацетамидную группы.

Линкеры включают двухвалентный радикал, такой как алкилдиил, арилен, гетероарилен, такие группы, как $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, повторяющиеся элементы из алкилокси (например, полиэтиленокси, PEG, полиметиленокси) и алкиламино (например, полиэтиленамино, JeffamineTM); и сложные эфиры и амиды двухосновных кислот, включая сукцинат, сукцинамид, дигликолят, малонат и капроамид.

Антитела со встроенными в них остатками цистеина реагируют с линкерными реагентами или промежуточными соединениями лекарственное средство-линкер с электрофильными функциональными группами, такими как малеимид или α -галокарбонил, в соответствии со способом конъюгации на странице 766 Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, и согласно протоколу примера 6.

Линкер может состоять из одного или нескольких линкерных компонентов. Иллюстративные линкерные компоненты включают 6-малеимидокапроил ("MC"), малеимидопропаноил ("MP"), валин-цитруллин ("val-cit" или "vc"), аланин-фенилаланин ("ala-phe" или "af"), п-аминобензилоксикарбонил ("PAB"), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат ("SPP"), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат ("SMCC"), N-сукцинимидил-(4-йодоацетил)аминобензоат ("SIAB"), этиленокси-CH₂CH₂O- в качестве одного или нескольких повторяющихся элементов ("EO" или "PEO"). Дополнительные линкерные компоненты известны в данной области и некоторые из них описаны в настоящем документе.

В одном варианте осуществления, линкер L в ADC имеет формулу:



где:

-A- представляет собой удлиняющий элемент, ковалентно связанный с тиольной группой цистеина в антителе (Ab);

a равно 0 или 1;

каждый -W- независимо представляет собой аминокислотный элемент;
 w независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 12;
 -Y- представляет собой спейсерный элемент, ковалентно связанный с группой
 лекарственного средства; и

у равно 0, 1 или 2.

Удлиняющий элемент

Удлиняющий элемент (-A-), когда он присутствует, способен связывать элемент
 антитела с аминокислотным элементом (-W-). В этом отношении, антитело (Ab) обладает
 функциональной группой, которая может образовывать связь с функциональной
 группой удлиняющего элемента. Подходящие функциональные группы, которые могут
 присутствовать на антителе, либо естественным образом, либо посредством химического
 манипулирования, включают, но не ограничиваются ими, сульфгидрил (-SH), amino,
 гидроксил, карбокси, аномерную гидроксильную группу углевода и карбоксил. В одном
 аспекте функциональные группы антитела представляют собой сульфгидрил или amino.
 Сульфгидрильные группы можно получать восстановлением внутримолекулярной
 дисульфидной связи антитела. Альтернативно сульфгидрильные группы можно получать
 реакцией аминокислоты лизина в антителе с использованием 2-иминотиолана (реагент
 Трота) или другого образующего сульфгидрил реагента. В одном варианте
 осуществления, антитело (Ab) обладает свободной тиольной группой цистеина, которая
 может образовывать связь с электрофильной функциональной группой удлиняющего
 элемента. Иллюстративные удлиняющие элементы в конъюгатах формулы I
 представлены с помощью формул II и III, где Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y являются такими,
 как определено выше, и R¹⁷ представляет собой двухвалентный радикал, выбранный
 из (CH₂)_r, C₃-C₈карбоциклила, O-(CH₂)_r, арилена, (CH₂)_r-арилена, -арилена-(CH₂)_r, (CH₂)_r
 -(C₃-C₈карбоциклила), (C₃-C₈карбоцикликil)-(CH₂)_r, C₃-C₈гетероциклила, (CH₂)_r-(C₃-C₈
 гетероциклила), -(C₃-C₈гетероцикликil)-(CH₂)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r, -(CH₂CH₂O)_r, -
 (CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂
 CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂- и -(CH₂CH₂O)_rC(O)
 NR^b(CH₂)_r; где R^b представляет собой H, C₁-C₆алкил, фенил или бензил; и r независимо
 представляет собой целое число в диапазоне 1-10.

Арилен включает двухвалентные ароматические углеводородные радикалы из 6-20
 атомов углерода, образованные удалением двух атомов водорода из ароматической
 кольцевой системы. Типичные группы ариленов включают, но не ограничиваются ими,
 радикалы, образованные из бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена,
 бифенила и т.п.

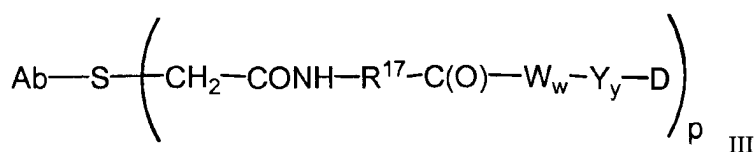
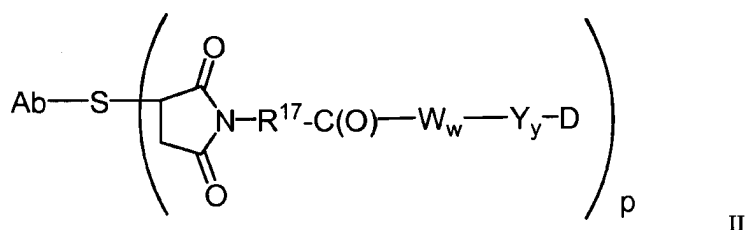
Гетероциклильные группы включают кольцевую систему, в которой один или
 несколько атомов кольца представляют собой гетероатом, например азот, кислород и
 серу. Гетероциклильный радикал содержит от 1 до 20 атомов углерода и от 1 до 3
 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. Гетероцикл может представлять собой
 моноцикл, имеющий от 3 до 7 членов в кольце (от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3
 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S) или бицикл, имеющий от 7 до 10 членов в
 кольце (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S),
 например: систему бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6]. Гетероциклы описаны в Paquette,
 Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в
 частности, в главах 1, 3, 4, 6, 7, и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of

Monographs" (John Wiley & Sons, New York, с 1950 по настоящее время), в частности в томах 13, 14, 16, 19, и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

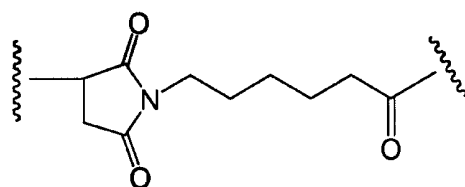
Примеры гетероциклов включают, в качестве неограничивающего примера, пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиофенил с окисленный серой, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталенил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азоцинил, триазилил, 6Н-1,2,5-тиадиазилил, 2Н,6Н-1,5,2-дитиазилил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хроменил, ксантенил, феноксатинил, 2Н-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3Н-индолил, 1Н-индазолил, пуринил, 4Н-хинолизинил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4Аh-карбазолил, карбазолил, β-карболинил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиперазинил, индолинил, изоиндолинил, хинуклидинил, морфолинил, оксазолидинил, бензотриазолил, бензизоксазолил, оксиндолил, бензоксазолинил и изатиноил.

Карбоциклические группы включают насыщенное или ненасыщенное кольцо, имеющее от 3 до 7 атомов углерода в качестве моноцикла или от 7 до 12 атомов углерода в качестве бицикла. Моноциклические карбоциклы имеют от 3 до 6 атомов в кольце, более конкретно 5 или 6 атомов в кольце. Бициклические карбоциклы имеют от 7 до 12 атомов в кольце, например, располагаемые по порядку как системы бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6], или 9 или 10 атомов в кольце, располагаемые по порядку как системы бицикло [5,6] или [6,6]. Примеры моноциклических карбоциклов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогептил и циклооктил.

Следует понимать для всех иллюстративных вариантов осуществления ADC формулы I, таких как II-VI, что даже когда явно не указано, с антителом связаны от 1 до 4 групп лекарственного средства (p=1-4), в зависимости от количества встроенных остатков цистеина.

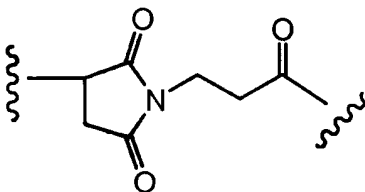


Иллюстративный удлиняющий элемент формулы II образован из малеимида-капроила (MC), где R¹⁷ представляет собой -(CH₂)₅-:



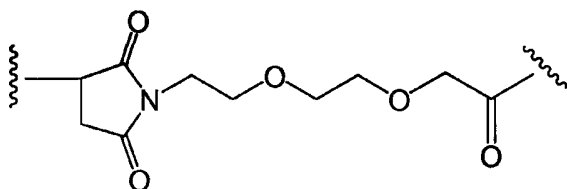
MC

Иллюстративный удлиняющий элемент формулы II образован из малеимидо-пропаноила (MP), где R^{17} представляет собой $-(CH_2)_2-$:

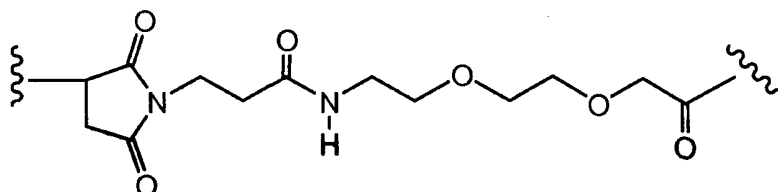


MP

Другой иллюстративный удлиняющий элемент формулы II представляет собой удлиняющий элемент, где R^{17} представляет собой $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, и r равно 2:

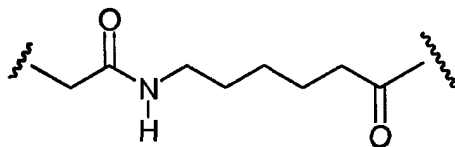


Другой иллюстративный удлиняющий элемент формулы II представляет собой удлиняющий элемент, где R^{17} представляет собой $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, где R^b представляет собой H и каждый r равен 2:

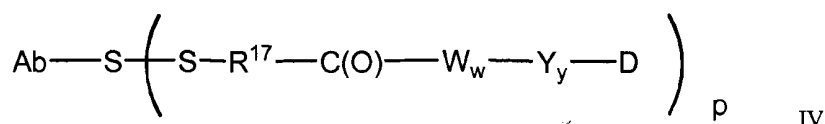


MPEG

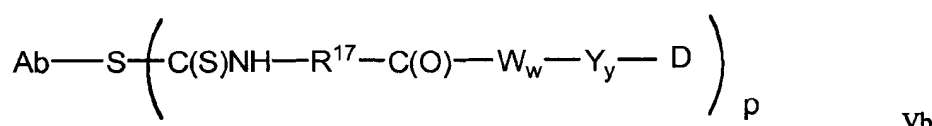
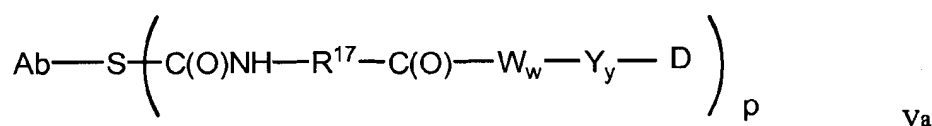
Иллюстративный удлиняющий элемент формулы III представляет собой удлиняющий элемент, где R^{17} представляет собой $-(CH_2)_5-$:



В другом варианте осуществления удлиняющий элемент связан с антителом против CD79b со встроенными в него остатками цистеина через дисульфидную связь между атомом серы, со встроенным в него цистеином в антителе и атомом серы удлиняющего элемента. Репрезентативный удлиняющий элемент этого варианта осуществления представлен посредством формулы IV, где R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y являются такими, как определено выше.



В другом варианте осуществления реакционно-способная группа удлиняющего элемента содержит реакционно-способную к тиольной группе функциональную группу, которая может образовывать связь со свободной тиольной группой цистеина в антителе. Примеры реакционно-способных к тиольной группе функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, малеимид, α -галоацетил, активированные сложные эфиры, такие как сукцинимидные сложные эфиры, 4-нитрофенильные сложные эфиры, пентафторфенильные сложные эфиры, тетрафторфенильные сложные эфиры, ангидриды, хлориды кислот, сульфонилхлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. Репрезентативные удлиняющие элементы этого варианта осуществления представлены посредством формул Va и Vb, где $-\text{R}^{17}$ -, Ab-, $-\text{W}_w$ -, $-\text{Y}_y$ -, $-\text{D}$, w и y являются такими, как определено выше:

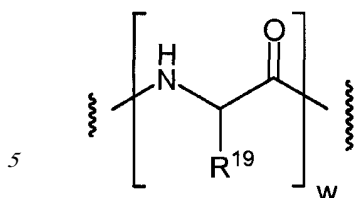


В другом варианте осуществления, линкер может представлять собой линкер дендритного типа для ковалентного присоединения более одной группы лекарственного средства посредством ветвящейся многофункциональной линкерной группы к антителу (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Дендритные линкеры могут повышать молярное соотношение лекарственного средства и антитела, т.е. нагрузку, которая связана с эффективностью ADC. Таким образом, когда антитело со встроенными в него остатками цистеина обладает только одной реактивной тиольной группой цистеина, множество групп лекарственного средства можно связывать через дендритный линкер.

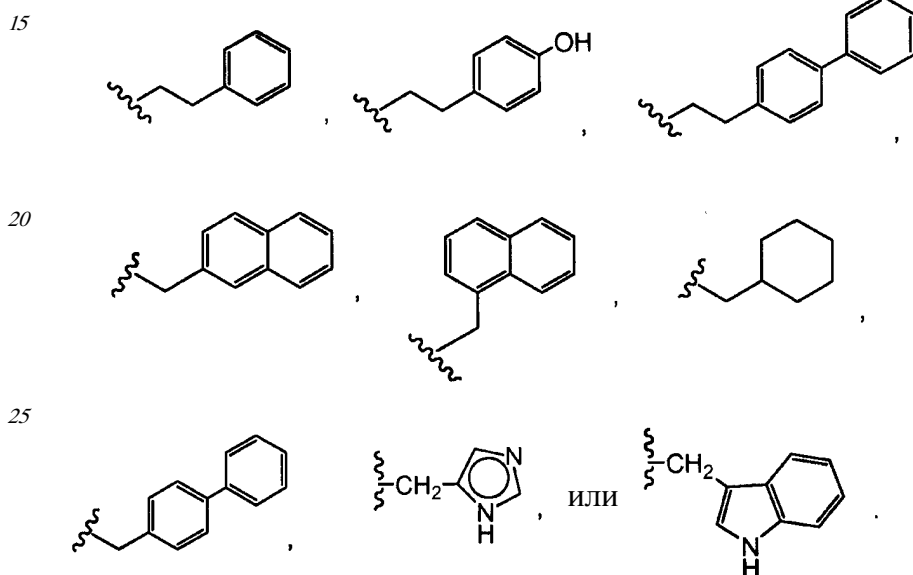
Аминокислотный элемент

Линкер может содержать аминокислотные остатки. Аминокислотный элемент ($-\text{W}_w$ -), когда он присутствует, связывает антитело (Ab) с группой лекарственного средства (D) в конъюгате антитела со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства (ADC) по изобретению.

$-\text{W}_w$ - представляет собой дипептидный, трипептидный, тетрапептидный, пентапептидный, гексапептидный, гептапептидный, октапептидный, нонапептидный, декапептидный, ундекапептидный или додекапептидный элемент. Аминокислотные остатки, которые составляют аминокислотный элемент, включают встречающиеся в природе аминокислотные остатки, а также минорные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Каждый элемент $-\text{W}_w$ - независимо имеет формулу, указанную ниже в квадратных скобках, и w представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 12:



где R^{19} представляет собой водород, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, бензил, п-гидроксibenзил, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2$
 10 CH_2CONH_2 , $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, фенил, циклогексил,



30 Когда R^{19} является отличным от водорода, атом углерода, с которым связан R^{19} , является хиральным. Каждый атом углерода, с которым связан R^{19} , независимо находится в (S)- или (R)-конфигурации, или представляет собой рацемическую смесь. Аминокислотные элементы, таким образом, могут быть энантиомерно чистыми, рацемическими или диастереомерными.

35 Иллюстративные аминокислотные элементы $-\text{W}_w-$ включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Иллюстративные дипептиды включают: валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Иллюстративные трипептиды включают: глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).
 40 Аминокислотные остатки, которые содержат компонент в виде аминокислотного линкера, включают встречающиеся в природе аминокислотные остатки, а также минорные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин.

Аминокислотный элемент может ферментативно расщепляться одним или
 45 несколькими ферментами, включая ассоциированную с опухолью протеазу, высвобождая группу лекарственного средства (-D), которая в одном варианте осуществления протонируется *in vivo* при высвобождении с образованием лекарственного средства (D). Компоненты в виде аминокислотных линкеров можно конструировать и

оптимизировать по их селективности к ферментативному расщеплению конкретными ферментами, например, ассоциированной с опухолью протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмينا.

Спейсерный элемент

5 Спейсерный элемент ($-Y_y-$), когда он присутствует ($y = 1$ или 2), связывает аминокислотный элемент ($-W_w-$) с группой лекарственного средства (D), когда аминокислотный элемент присутствует ($w=1-12$). Альтернативно, спейсерный элемент связывает удлиняющий элемент с группой лекарственного средства, когда

10 аминокислотный элемент отсутствует. Спейсерный элемент также связывает группу лекарственного средства с элементом антитела, когда как аминокислотный элемент, так и удлиняющий элемент, отсутствуют ($w, y = 0$). Спейсерные элементы представляют собой элементы двух основных типов: самоотщепляющийся и не способный к самостоятельному отщеплению. Не способный к самостоятельному отщеплению

15 спейсерный элемент представляет собой элемент, в котором часть спейсерного элемента или весь спейсерный элемент остаются связанными с группой лекарственного средства после отщепления, в частности ферментативного, аминокислотного элемента от конъюгата антитело-лекарственное средство или группы лекарственного средство-линкер. Когда ADC, содержащий глицин-глициновый спейсерный элемент или

20 глициновый спейсерный элемент претерпевает ферментативное расщепление ассоциированной с опухолевыми клетками протеазой, ассоциированной с клетками злокачественной опухоли протеазой или ассоциированной с лимфоцитами протеазой, группа глицин-глицин-лекарственное средство или группа глицин-лекарственное средство отщепляется от $Ab-A_3-W_w-$. В одном варианте осуществления, происходит

25 независимая реакция гидролиза в клетке-мишени, расщепляющая связь глицин-группа лекарственного средства и высвобождающая лекарственное средство.

В другом варианте осуществления, $-Y_y-$ представляет собой p -аминобензилкарбамоильный (PAB) элемент, фениленовая часть которого замещена Q_m , где Q представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-O-(C_1-C_8$ алкил), -галоген, -нитро или -циано;

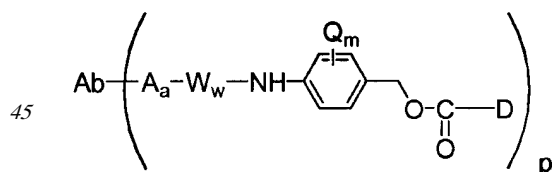
30 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-4.

Иллюстративные варианты осуществления не способного к самостоятельному отщеплению спейсерного элемента ($-Y-$) представляют собой: $-Gly-Gly-$; $-Gly-$; $-Ala-Phe-$; $-Val-Cit-$.

В одном варианте осуществления, предусматриваются группа лекарственного средства-линкер или ADC, в которых спейсерный элемент отсутствует ($y=0$), или их фармацевтически приемлемая соль или сольват.

Альтернативно ADC, содержащий самоотщепляющийся спейсерный элемент, может высвобождать $-D$. В одном варианте осуществления, $-Y-$ представляет собой группу PAB, которая связана с $-W_w-$ через атом азота аминогруппы в группе PAB, и связана

40 прямо с $-D$ через карбонат, карбамат или простую эфирную группу, где ADC имеет иллюстративную структуру:

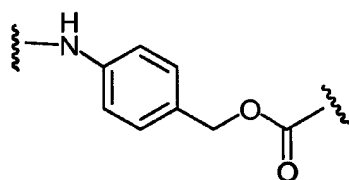


где Q представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-O-(C_1-C_8$ алкил), -галоген, -нитро или -циано;

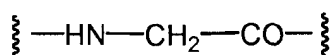
m представляет собой целое число в диапазоне 0-4; и p находится в диапазоне от 1 до 4.

Другие примеры самоотщепляющихся спейсеров включают, но не ограничиваются ими, ароматические соединения, которые являются электронно сходными с группой PAB, такой как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), гетероциклические аналоги PAB (US 2005/0256030), бета-глюкуронид (WO 2007/011968), и орто- или пара-аминобензилацетали. Можно использовать спейсеры, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2:223), соответствующим образом замещенные кольцевые системы бицикло [2.2.1] и бицикло[2.2.2] (Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Устранение содержащих амин лекарственных средств, которые замещены по глицину (Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27: 1447), также является примером самоотщепляющегося спейсера, пригодного в ADC.

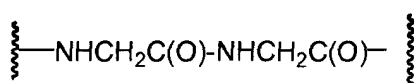
Иллюстративные спейсерные элементы ($-Y_y-$) соответствуют формулам X-XII:



X



XI

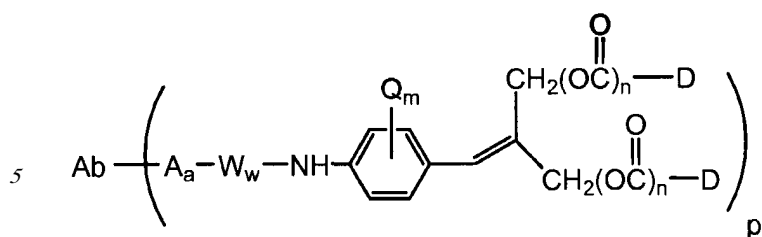


XII

Дендритные линкеры

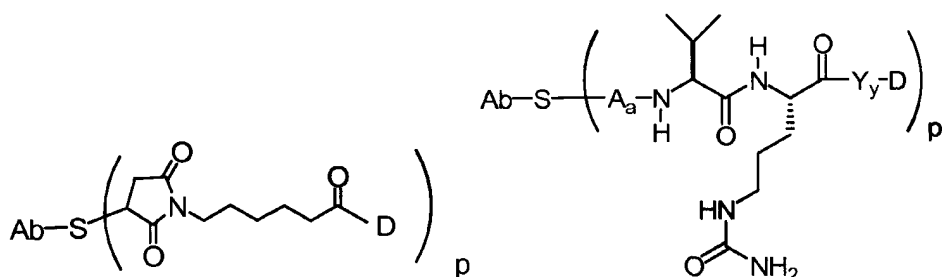
В другом варианте осуществления, линкер L может представлять собой линкер дендритного типа для ковалентного присоединения более одной группы лекарственного средства посредством ветвящейся многофункциональной линкерной группы к антителу (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768). Дендритные линкеры могут повышать молярное соотношение лекарственного средства и антитела, т.е. нагрузку, которая связана с эффективностью ADC. Таким образом, когда антитело со встроенными в него остатками цистеина обладает только одной реактивной тиольной группой цистеина, множество групп лекарственного средства можно связывать через дендритный линкер. Иллюстративные варианты осуществления разветвленных дендритных линкеров включают 2,6-бис(гидроксиметил)-п-крезольный и 2,4,6-трис(гидроксиметил)фенольный дендримерные элементы (WO 2004/01993; Szalai et al. (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689; Shamis et al. (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126: 1726-1731; Amir et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499).

В одном варианте осуществления, спейсерный элемент представляет собой разветвленный бис(гидроксиметил)стирол (BHMS), который можно использовать для включения и высвобождения множества лекарственных средств, имеющих структуру:



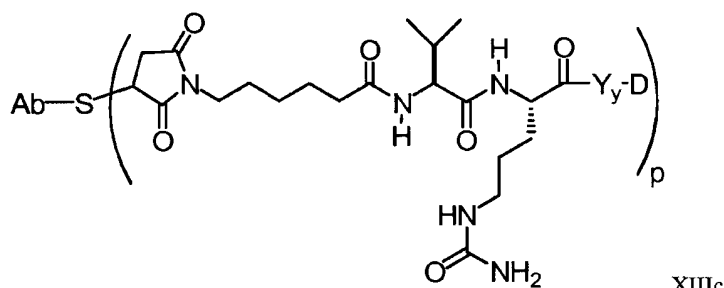
содержащую 2-(4-аминобензилиден)пропан-1,3-диольный дендримерный элемент (WO 2004/043493; de Groot et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), где Q представляет собой -C₁-C₈алкил, -O-(C₁-C₈алкил), -галоген, -нитро или -циано; m
10 представляет собой целое число в диапазоне 0-4; n равно 0 или 1; и p находится в диапазоне от 1 до 4.

Иллюстративные варианты осуществления соединений конъюгата антитело-
лекарственное средство формулы I включают XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-
15 cit) и XIIId (MC-val-cit-PAB):

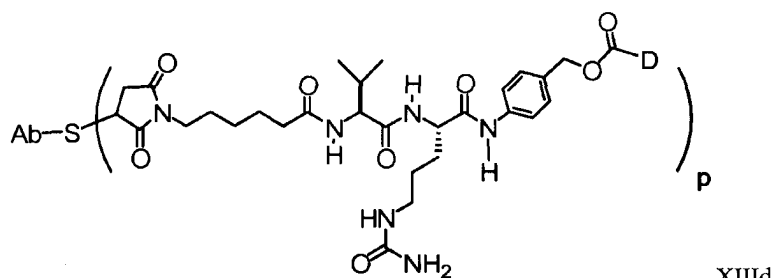


XIIIa

XIIIb

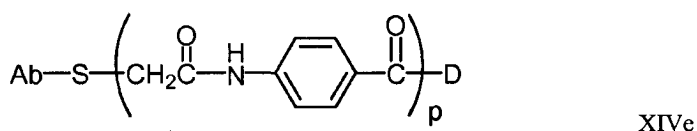
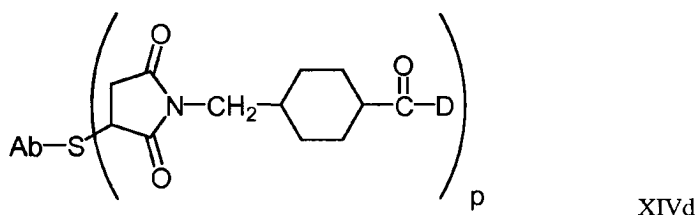
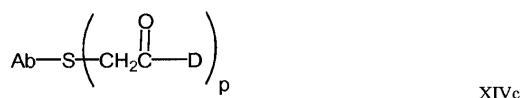
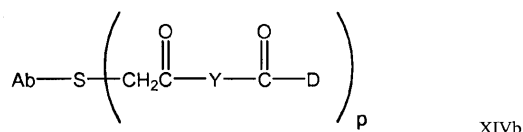
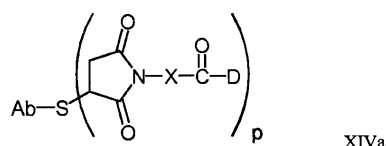


XIIIc

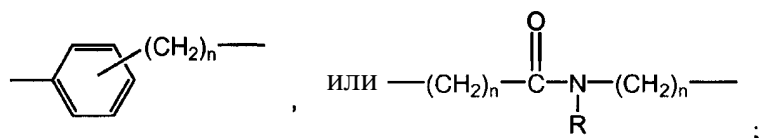
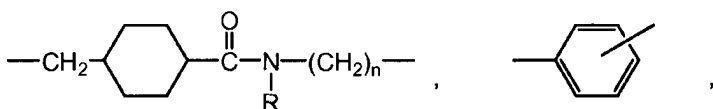
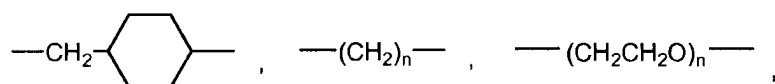


XIIIId

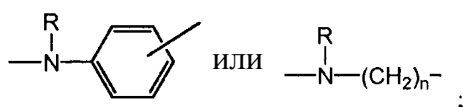
Другие иллюстративные варианты осуществления соединений конъюгата антитело-
лекарственное средство формулы Ia включают XIVa-e:



где X представляет собой



Y представляет собой



и R независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил; и n равно от 1 до 12.

В другом варианте осуществления, линкер имеет реакционноспособную функциональную группу, которая имеет нуклеофильную группу, которая является реакционно-способной к электрофильной группе, имеющейся в антителе. Подходящие электрофильные группы на антителе включают, но не ограничиваются ими, карбонильные группы альдегидов и кетонов. Гетероатом нуклеофильной группы линкера может реагировать с электрофильной группой на антителе и образовывать ковалентную связь в элементе антитела. Подходящие нуклеофильные группы на линкере включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, амина, гидразин,

тиосемикарбазон, гидразина карбоксилат и арилгидразид. Электрофильная группа на антителе обеспечивает удобный участок для связывания с линкером.

Как правило, линкеры пептидного типа можно получать путем образования пептидной связи между двумя или несколькими аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, в соответствии со способом жидкофазного синтеза (E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Линкерные промежуточные соединения можно получать любым сочетанием или последовательностью реакций, включающих спейсерный, удлиняющий и аминокислотный элементы. В спейсерном, удлиняющем и аминокислотном элементах могут быть использованы реакционно-способные функциональные группы, которые по своим свойствам являются электрофильными, нуклеофильными или свободными. Реакционно-способные функциональные группы включают, но не ограничиваются ими, карбоксилы, гидроксилы, пара-нитрофенилкарбонат, изотиоцианат и уходящие группы, такие как О-мезил, О-тозил, -Cl, -Br, -I или малеимид.

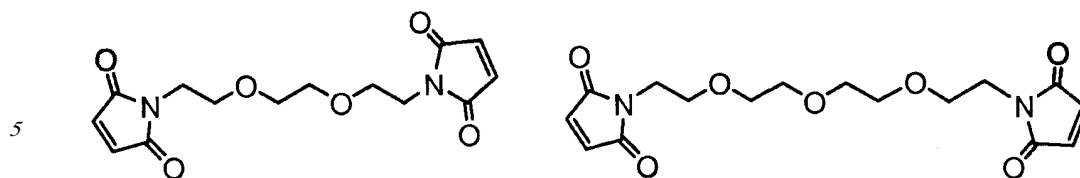
Например, заряженный заместитель, такой как сульфат ($-\text{SO}_3^-$) или аммоний, может повышать растворимость в воде реагента и облегчать реакцию связывания линкерного реагента с антителом или группой лекарственного средства, или облегчать реакцию связывания Ab-L (промежуточное соединение антитело-линкер) с D, или D-L (промежуточное соединение лекарственное средство-линкер) с Ab, в зависимости от способа синтеза, используемого для получения ADC.

Линкерные реагенты

Конъюгаты антитела и ауристатиона можно получать с использованием множества бифункциональных линкерных реагентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидозэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат), и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

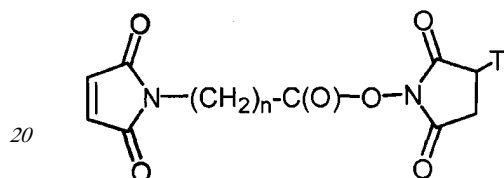
Конъюгаты антитело-лекарственное средство также можно получать с помощью следующих линкерных реагентов: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, и сульфо-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), и включая бис-малеимидные реагенты: DTME, BMB, BMDb, BMH, BMOE, 1,8-бис-малеимидодиэтиленгликоль ($\text{BM}(\text{PEO})_2$), и 1,11-бис-малеимидотриэтиленгликоль ($\text{BM}(\text{PEO})_3$), которые являются коммерчески доступными от Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, и других поставщиков реагентов. Бис-малеимидные реагенты позволяют присоединение тиольной группы антитела со встроенными в него остатками цистеина к тиол-содержащей группе лекарственного средства, метке или линкерному промежуточному соединению, последовательно или одновременно. Другие функциональные группы, кроме малеимида, которые являются реакционно-способными к тиольной группе антитела со встроенными в него остатками цистеина, группе лекарственного средства, метке или линкерному промежуточному соединению включают йодацетамид, бромацетамид, винилпирдин,

дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат.

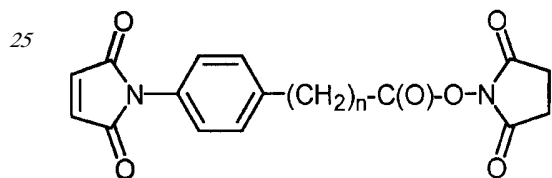
BM(PEO)₂BM(PEO)₃

10 Подходящие линкерные реагенты также можно получать посредством других коммерческих источников, таких как Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), или синтезировать в соответствии со способами, описанными в Toki et al. (2002) J. Org. Chem. 67: 1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al. (1996) Bioconjugate Chem. 7: 180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; и WO 04/032828.

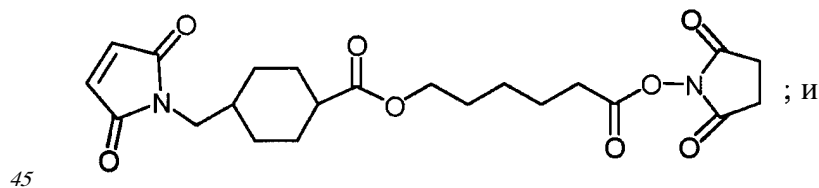
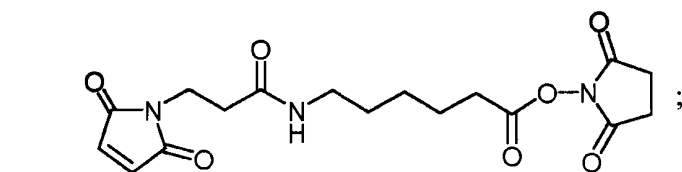
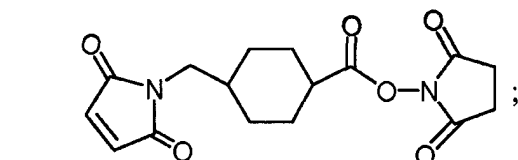
15 Удлиняющие элементы формулы (IIIa) можно встраивать в линкер путем реакции следующих линкерных реагентов с N-концом аминокислотного элемента:

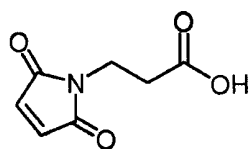


где n представляет собой целое число в диапазоне 1-10, и T представляет собой -H или -SO₃Na;

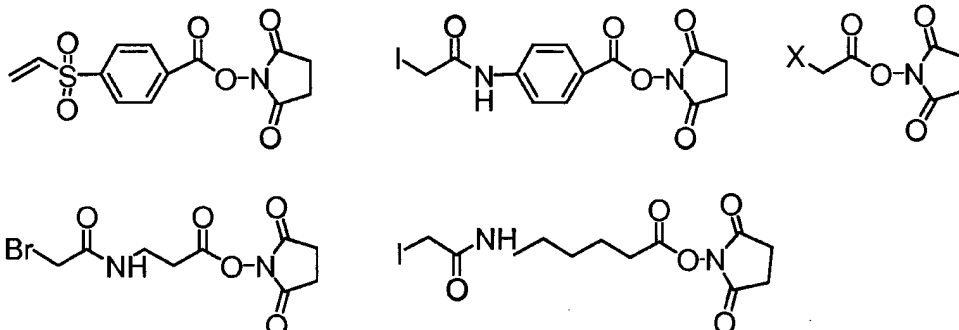


30 где n представляет собой целое число в диапазоне 0-3;



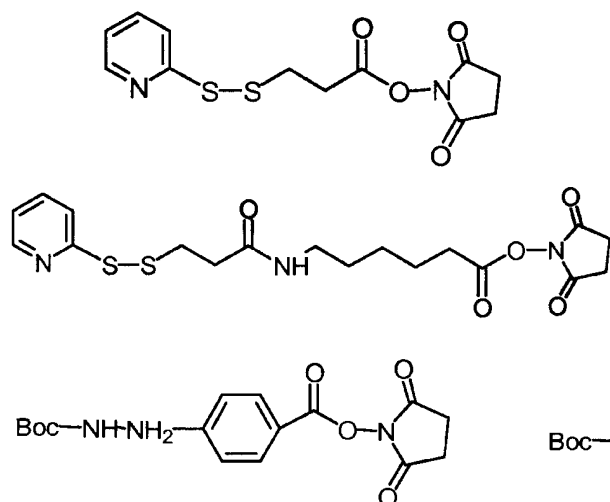


Удлиняющие элементы можно встраивать в линкер путем реакции следующих бифункциональных реагентов с N-концом аминокислотного элемента:

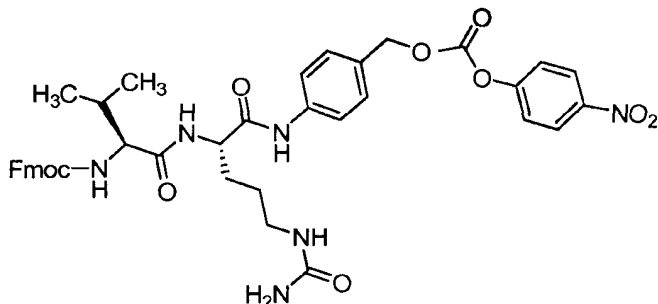


где X представляет собой Br или I.

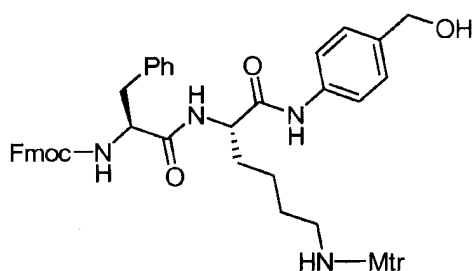
Удлиняющие элементы формулы также можно встраивать в линкер путем реакции следующих бифункциональных реагентов с N-концом аминокислотного элемента:



Иллюстративный дипептидный линкерный реагент валин-цитруллин (val-cit или vc), имеющий малеимидный удлиняющий элемент и пара-аминобензилкарбамоильный (PAB) самоотщепляющийся спейсер, имеет структуру:



Иллюстративный дипептидный линкерный реагент phe-lys(Mtr, моно-4-метокситритил), имеющий малеимидный удлиняющий элемент и самоотщепляющийся спейсерный элемент PAB, можно получать в соответствии с Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, и он имеет структуру:



Получение конъюгатов антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства

ADC формулы I можно получать несколькими способами, с использованием реакций, условий и реагентов органической химии, известных специалистам в данной области, включая: (1) реакцию группы цистеина в антителе со встроенными в него остатками цистеина с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения антитело-линкер Ab-L, через ковалентную связь, с последующей реакцией с активированной группой лекарственного средства D; и (2) реакцией нуклеофильной группы в группе лекарственного средства с линкерным реагентом, с образованием промежуточного соединения лекарственное средство-линкер D-L, через ковалентную связь, с последующей реакцией с группой цистеина в антителе со встроенными в него остатками цистеина. Для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы I способы конъюгации (1) и (2) можно использовать с различными антителами со встроенными в них остатками цистеина, группами лекарственного средства и линкерами.

Тиольные группы цистеина антитела являются нуклеофильными и способны вступать в реакции с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных реагентах и промежуточных соединениях лекарственное средство-линкер, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBT, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) группы альдегидов, кетонов, карбоксильные и малеимидные группы, и (iv) дисульфиды, включая пиридинильные дисульфиды, путем сульфидного обмена. Нуклеофильные группы на группе лекарственного средства включают, но не ограничиваются ими: аминогруппу, тиольную, гидроксильную группы, группу гидразида, оксима, гидразина, тиосемикарбазона, карбоксилата гидразина и арилгидразида, способные вступать в реакции с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных группах и линкерных реагентах.

Реакционную способность антитела для конъюгации с линкерными реагентами можно обеспечивать посредством обработки восстановителем, таким как DTT (дитиотреитол, реагент Клеланда) или TCEP (гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), с последующим повторным окислением с образованием межцепочечных и внутрицепочечных дисульфидных связей (пример 5). Например, интактные моноклональные антитела со встроенными в них остатками цистеина (тио-Mab), экспрессированные в клетках CHO, восстанавливают посредством приблизительно 50-кратного молярного избытка TCEP в течение 3 ч при 37°C для восстановления дисульфидных связей в аддуктах цистеина, которые могут образовываться между вновь встроенными остатками цистеина и цистеином, присутствующим в культуральной среде. Восстановленное тио-Mab разбавляют и помещают в колонку HiTrap S в 10 mM ацетате натрия, pH 5, и элюируют посредством PBS, содержащего 0,3 M хлорид натрия. Дисульфидные связи между остатками цистеина исходного Mab повторно устанавливают с помощью разбавленного

(200 нМ) водного сульфата меди (CuSO_4) при комнатной температуре в течение ночи.

Альтернативно дегидроаскорбиновая кислота (ДНАА) является эффективным окислителем для повторного восстановления внутрицепочечных дисульфидных групп антитела со встроенными в него остатками цистеина после восстановительного расщепления аддуктов цистеина. Также можно использовать другие окислители, т.е. окисляющие агенты, и условия окисления, которые известны в данной области. Также является эффективным окисление окружающим воздухом. На этой стадии мягкого частичного повторного окисления эффективно образуются внутрицепочечные дисульфиды с высокой точностью и сохраняются тиольные группы вновь встроенных остатков цистеина. Приблизительно 10-кратный избыток промежуточного соединения лекарственное средство-линкер, например MC-vc-PAB-MMAE, добавляли, перемешивали и позволяли стоять в течение приблизительно одного часа при комнатной температуре для обеспечения конъюгации и образования конъюгата антитело против CD79b-лекарственное средство. Смесь для конъюгации фильтровали и помещали в колонку HiTrap S и элюировали из нее для удаления избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер и других примесей.

На фигуре 16 представлен общий процесс получения антитела со встроенными в него остатками цистеина, экспрессированного из клеточной культуры, для конъюгации. Когда клеточная культуральная среда содержит цистеин, могут образовываться дисульфидные аддукты между вновь встроенной аминокислотой цистеина и цистеином из среды. Эти аддукты цистеина, представленные в качестве окружности в иллюстративном тио-Mab (слева) на фигуре 16, необходимо восстанавливать для получения антител со встроенными в них остатками цистеина, реакционно-способными для конъюгации. Аддукты цистеина, вероятно вместе с различными межцепочечными дисульфидными связями, подвергают восстановительному расщеплению с получением восстановленной формы антитела с помощью восстановителей, таких как TCEP. Межцепочечные дисульфидные связи между спаренными остатками цистеина повторно образуются в условиях частичного окисления с сульфатом меди, ДНАА, или под воздействием окружающего кислорода. Вновь встроенные, сконструированные и неспаренные остатки цистеина остаются доступными для реакции с линкерными реагентами или промежуточными соединениями лекарственное средство-линкер с образованием конъюгатов антитела по изобретению. Тио-Mab, экспрессированные в клеточных линиях млекопитающих, приводят к конъюгату находящегося снаружи аддукта Cys со встроенным Cys через образование связи -S-S-. Таким образом, очищенные тио-Mab обрабатывают путем процессов восстановления и повторного окисления, как описано в примере 5 с получением реакционно-способных тио-Mab. Эти тио-Mab используют в конъюгате с содержащими малеимид цитотоксическими лекарственными средствами, флуорофорами и другими метками.

10. Иммунолипосомы

Антитела против CD79b, описанные в настоящем документе, также можно изготавливать в виде иммунолипосом. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые подходят для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно образуют двухслойную структуру, сходную с размещением липидов биологических мембран. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, такими как описано в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); патентах США No. 4485045 и 4544545; и WO97/38731,

опубликованной 23 октября 1997 года. Липосомы с усиленным временем циркуляции описаны в патенте США No. 5013556.

Особенно подходящие липосомы можно получать способом обращено-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и производное фосфатидилэтаноламина с PEG (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор с получением липосомы с требуемым диаметром. Fab'-фрагменты антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) посредством реакции дисульфидного обмена. В липосоме необязательно содержится химиотерапевтическое средство. См. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989).

В. Определенные способы получения антител

1. Скрининг антитела против CD79b с требуемыми свойствами

Способы получения антител, которые связываются с полипептидами CD79b, описаны выше. Если желательно, можно отбирать антитела с определенными биологическими характеристиками.

Эффекты антитела против CD79b по изобретению на ингибирование роста можно оценивать посредством способов, известных в данной области, например, с использованием клеток, которые экспрессируют полипептид CD79b либо эндогенно, либо после трансфекции гена CD79b. Например, соответствующие клеточные линии опухолей и клетки, трансфицированные CD79b, можно обрабатывать моноклональным антителом против клетки по изобретению в различных концентрациях в течение нескольких суток (например, 2-7 суток) и окрашивать кристаллическим фиолетовым или МТТ или анализировать каким-либо другим колориметрическим способом анализа.

Другой способ определения пролиферации представляет собой сравнение захвата ³H-тимидина обработанными клетками в присутствии и отсутствии антитела против клетки по изобретению. После обработки антителом клетки собирают и определяют величину радиоактивности полученной ДНК, в сцинтилляционном счетчике. Соответствующие положительные контроли включают обработку выбранной клеточной линии ингибирующим рост антителом, в отношении которого известно, что оно ингибирует рост этой клеточной линии. Ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo* можно определять различными способами, известными в данной области. Клетка опухоли может представлять собой клетку, которая сверхэкспрессирует полипептид CD79b. Антитело против CD79b ингибирует клеточную пролиферацию экспрессирующей CD79b опухолевой клетки *in vitro* или *in vivo* приблизительно на 25-100% по сравнению с необработанной опухолевой клеткой, более предпочтительно, приблизительно на 30-100%, и еще более предпочтительно приблизительно на 50-100% или 70-100%, в одном варианте осуществления, при концентрации антитела приблизительно от 0,5 до 30 мкг/мл. Ингибирование роста можно определять при концентрации антитела приблизительно от 0,5 до 30 мкг/мл или приблизительно от 0,5 нМ до 200 нМ в клеточной культуре, где ингибирование роста определяют через 1-10 суток после воздействия на опухолевые клетки антитела. Антитело является ингибирующим рост *in vivo*, если введение антитела против CD79b в количестве от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела приводит к снижению размера опухоли и к снижению пролиферации опухолевых клеток в пределах приблизительно от 5 суток до 3 месяцев после первого введения антитела, предпочтительно в пределах приблизительно от 5 до 30 суток.

Для селекции антитела против CD79b, которое вызывают гибель клеток, можно оценивать потерю целостности мембраны, как указано, например, посредством захвата

йодида пропидия (PI), трипанового синего или 7AAD, относительно контроля. Анализ захвата PI можно проводить в отсутствии комплемента и иммунных эффекторных клеток. Экспрессирующие полипептид CD79b клетки опухоли инкубируют со средой отдельно или со средой, содержащей соответствующее моноклональное антитело против CD79b (например, в концентрации 10 мкг/мл). Клетки инкубируют в течение 3 суток. После каждой обработки клетки промывают и разделяют на аликвоты в накрытые сеткой 35-мм пробирки 12×75 (1 мл на пробирку, 3 пробирки на обрабатываемую группу) для удаления клеточных комков. Затем в пробирки добавляют PI (10 мкг/мл). Образцы можно анализировать с использованием проточного цитометра FACSCAN™ и программного обеспечения FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Антитела против CD79b, которые приводят к статистически достоверному уровню клеточной гибели, определенной по захвату PI, можно отбирать в качестве индуцирующих клеточную гибель антител против CD79b.

Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом на полипептиде CD79b, связываемом представляющим интерес антителом, можно проводить общепринятый анализ перекрестного блокирования, такой как описан в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Этот анализ можно использовать для определения наличия связывания антитела с тем же участком или эпитопом, с которым связывается известное антитело против CD79b по этому изобретению. Альтернативно, или дополнительно, можно проводить картирование эпитопов способами, известными в данной области. Например, для выявления контактных остатков в последовательность антитела можно вносить мутации, например, сканированием аланином. Мутантное антитело первоначально тестируют на связывание с поликлональным антителом для обеспечения требуемого сворачивания. В другом способе, пептиды, соответствующие различным участкам полипептида CD79b, можно использовать в способах конкурентного анализа с тестируемыми антителами или с тестируемым антителом и антителом с охарактеризованным или известным эпитопом.

2. Некоторые способы скрининга библиотек

Антитела против CD79b по изобретению можно получать с использованием комбинаторных библиотек для скрининга антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны различные способы создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Такие способы описаны, главным образом, в Hoogenboom et al. (2001), *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), и в определенных вариантах осуществления, в Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

По существу, клоны синтетических антител подвергают селекции посредством библиотек фагового дисплея, которые содержат фаг, который экспонирует различные фрагменты варибельной области (Fv) антитела, слитые с белком оболочки фага. Такие фаговые библиотеки сортируют с помощью аффинной хроматографии против требуемого антигена. Клоны, экспрессирующие Fv-фрагменты, способные связываться с требуемым антигеном, адсорбируются на антиген и, таким образом, их отделяют от несвязывающих клонов в библиотеке. Затем связывающие клоны элюируют от антигена, и их содержание можно далее повышать посредством дополнительных циклов адсорбции/элюирования антигена. Путем разработки подходящего способа скрининга с помощью антигена для селекции представляющего интерес клон фага с последующим конструированием клон интактного антитела против CD79b с использованием последовательностей Fv из представляющего интерес фагового клон и подходящих

последовательностей константной области (Fc), описанных в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3, можно получать любые из антител против CD79b по изобретению.

В определенных вариантах осуществления, антиген-связывающий домен антитела образован из двух переменных (V) областей приблизительно из 110 аминокислот, по одной из легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, в обеих из которых присутствуют три гиперпеременные петли (HVR) или определяющие комплементарность области (CDR). Переменные домены могут функционально экспонироваться на фаге, либо в качестве одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), в которых VH и VL ковалентно связаны через короткий подвижный пептид, либо в качестве Fab-фрагментов, в которых они обе являются слитыми с константным доменом и взаимодействуют нековалентно, как описано в Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Как используют в настоящем документе, фаговые клоны, кодирующие scFv, и фаговые клоны, кодирующие Fab, совместно называют "фаговыми клонами Fv" или "клонами Fv".

Репертуары генов VH и VL можно по отдельности клонировать полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и подвергать случайной рекомбинации в фаговых библиотеках, в которых затем проводят поиск антиген-связывающих клонов, как описано в Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12: 433-455 (1994). Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают высокоаффинные антитела к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. Альтернативно, можно клонировать наивный репертуар для обеспечения одного источника антител человека к широкому диапазону несобственных, а также собственных антигенов без иммунизации, как описано Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). В заключение, библиотеки с наивным репертуаром также можно получать синтетически путем клонирования не подвергнутых реаранжировке сегментов V-генов из стволовых клеток, и использования праймеров для ПЦР, содержащих случайную последовательность, для кодирования высоко переменных областей CDR3 и для проведения реаранжировки *in vitro*, как описано Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227: 381-388 (1992).

В определенных вариантах осуществления используют нитевидные фаги для экспонирования фрагментов антител путем слияния с минорным белком оболочки рIII. Фрагменты антител могут быть экспонированы в виде одноцепочечных Fv-фрагментов, в которых VH- и VL-домены связаны на одной полипептидной цепи подвижным полипептидным спейсером, например, как описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или в качестве Fab-фрагментов, в которых одна цепь является слитой с рIII, а другая секретируется в периплазму бактериальной клетки-хозяина, где собирается структура Fab-белок оболочки, которая экспонируется на поверхности фага путем вытеснения некоторых из белков оболочки дикого типа, например, как описано в Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

Как правило, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты гена антитела, получают из иммунных клеток, полученных от человека или животных. Если является желательной библиотека, смещенная в сторону клонов, направленных против CD79b, индивида иммунизируют посредством CD79b для обеспечения антительного ответа, и выделяют клетки селезенки и/или циркулирующие В-клетки, и другие лимфоциты периферической крови человека (PBL) для конструирования библиотеки. В предпочтительном варианте осуществления, получают библиотеку фрагментов гена антитела человека, смещенную в сторону клонов, направленных против CD79b, путем обеспечения ответа антител против CD79b у трансгенной мыши, обладающей функциональным набором генов иммуноглобулинов человека (и лишенной функциональной эндогенной системы

продукции антител), так что иммунизация посредством CD79b приводит к возникновению В-клеток, продуцирующих антитела человека против CD79b. Создание продуцирующих антитела человека трансгенных мышей описано ниже.

Дополнительное повышение содержания популяций клеток, реактивных против CD79b, можно обеспечивать с использованием подходящего способа скрининга для выделения В-клеток, экспрессирующих специфичное к CD79b мембраносвязанное антитело, например, путем разделения клеток с использованием аффинной хроматографии с CD79b или адсорбции клеток на меченный флуорохромом CD79b с последующей активированной флуоресценцией сортировкой клеток (FACS).

Альтернативно применение клеток селезенки и/или В-клеток или других PBL от неиммунизированного донора обеспечивает лучшее представление возможного репертуара антител, и а также позволяет конструирование библиотеки антител с использованием любого вида животных (человека или не относящегося к человеку), в котором CD79b не является антигенным. Для библиотек, включающих конструирование генов антител *in vitro*, собирают стволовые клетки индивида для получения нуклеиновых кислот, кодирующих не подвергнутые реаранжировке сегменты генов антител. Представляющие интерес иммунные клетки можно получать из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса, виды зайцеобразных, волчьих, собачьих, кошачьих, свиней, крупного рогатого скота, лошадей и птиц и т.д.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельные сегменты генов (включая сегменты VH и VL) выделяют из представляющих интерес клеток и амплифицируют. В случае подвергнутых реаранжировке библиотек генов VH и VL, требуемую ДНК можно получать путем выделения геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с праймерами, совпадающими с 5'- и 3'-концами подвергнутых реаранжировке генов VH и VL, как описано в Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), тем самым получая разнообразные репертуары V-генов для экспрессии. V-гены можно амплифицировать из кДНК и геномной ДНК с помощью обратных праймеров на 5'-конце экзона, кодирующего зрелый V-домен, и прямых праймеров, располагающихся в J-сегменте, как описано в Orlandi et al. (1989) и Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Однако для амплификации из кДНК, обратные праймеры также могут располагаться в лидерном экзоне, как описано в Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), а прямые праймеры могут располагаться в константной области, как описано в Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Для максимального повышения комплементарности, в праймеры можно включать вырожденность, как описано в Orlandi et al. (1989) или Sastry et al. (1989). В определенных вариантах осуществления, разнообразие библиотеки максимально увеличивают с использованием праймеров ПЦР, направленных на каждое семейство V-генов для амплификации всех доступных расположений VH и VL, присутствующих в образце нуклеиновой кислоты иммунных клеток, например, как описано в способе Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) или как описано в способе Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в экспрессирующие векторы, в праймер для ПЦР можно вносить редкие участки рестрикции в качестве метки на одном конце, как описано в Orlandi et al. (1989), или путем дальнейшей амплификации посредством ПЦР с праймером с меткой, как описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Репертуары подвергнутых синтетической реаранжировке V-генов можно получать *in vitro* из сегментов V-генов. Большинство из сегментов VH-генов человека были клонированы и отсеквенированы (как описано в Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-

798 (1992)), и картированы (описано в Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993); эти клонированные сегменты (включая все главные конформации петли H1 и H2) можно использовать для получения разнообразных репертуаров VH-генов с помощью праймеров для ПЦР, кодирующих петли H3 с разнообразной последовательностью и длиной, как описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Также можно получать репертуары VH, где все разнообразие последовательности сфокусировано в длинной петле H3 с единой длиной, как описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Сегменты V κ и V λ человека были клонированы и отсекушены (описано в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) и их можно использовать для получения синтетических репертуаров легких цепей. Синтетические репертуары V-генов, на основе ряда сборок VH и VL, и длин L3 и H3, кодируют антитела со значительным структурным разнообразием. После амплификации ДНК, кодирующей V-ген, сегменты V-генов зародышевой линии можно подвергать реаранжировке *in vitro* в соответствии со способами Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Репертуары фрагментов антител можно конструировать, комбинируя репертуары генов VH и VL различными путями. Каждый репертуар можно создавать в отдельных векторах, и векторы подвергать рекомбинации *in vitro*, например, как описано в Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), или *in vivo* путем комбинаторной инфекции, например, с помощью системы loxP, описанной в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). В подходе рекомбинации *in vivo* используется двухцепочечная структура Fab-фрагментов для преодоления ограничения размера библиотеки, определяемого эффективностью трансформации *E. coli*. Наивные репертуары VH и VL клонируют по отдельности, один в плазмиду, а другой в фаговый вектор. Затем две библиотеки комбинируют посредством инфекции фагом содержащих фагмиду бактерий, так что каждая клетка содержит отличающееся сочетание, и размер библиотеки ограничивается только числом присутствующих клеток (приблизительно 10^{12} клонов). Оба вектора содержат сигналы рекомбинации *in vivo*, так что гены VH и VL рекомбинируют в один репликон и совместно упаковываются в фаговые вирионы. Эти огромные библиотеки обеспечивают большие количества разнообразных антител с высокой аффинностью (K_d^{-1} приблизительно 10^8 M).

Альтернативно репертуары можно клонировать последовательно в один вектор, например, как описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), или объединять посредством ПЦР, а затем клонировать, например как описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Сборку посредством ПЦР также можно использовать для связывания ДНК VH и VL с ДНК, кодирующей подвижный пептидный спейсер, с образованием репертуаров одноцепочечных Fv (scFv). В другом способе используют "сборку посредством ПЦР в клетках" для объединения генов VH и VL в лимфоцитах посредством ПЦР, а затем клонирования репертуаров связанных генов, как описано в Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Антитела, продуцируемые наивными библиотеками (либо природными, либо синтетическими) могут иметь умеренную аффинность (K_d^{-1} приблизительно от 10^6 до 10^7 M $^{-1}$), однако созревание аффинности также можно имитировать *in vitro* посредством конструирования и повторной селекции из вторичных библиотек, как описано в Winter et al. (1994), выше. Например, мутацию можно вносить случайным образом *in vitro* с использованием полимеразы с пониженной точностью (описано Leung et al., Technique,

1: 11-15 (1989)) в способе Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) или в способе Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Кроме того, созревание аффинности можно проводить путем внесения мутации случайным образом в одну или несколько CDR, например с использованием ПЦР с праймерами, имеющими случайную последовательность, охватывающую представляющую интерес CDR, в выбранных отдельных клонах Fv, и скринингом на клоны с наиболее высокой аффинностью. В WO 9607754 (опубликованной 14 марта 1996 года) описан способ индукции мутагенеза в определяющей комплементарности области легкой цепи иммуноглобулина для создания библиотеки генов легкой цепи. Другим эффективным подходом является рекомбинация VH- или VL-доменов, отобранных посредством фагового дисплея, с репертуарами встречающихся в природе вариантов V-доменов, полученными из неиммунизированных доноров, и скрининг на наиболее высокую аффинность в нескольких раундах повторной перетасовки цепей, как описано в Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Этот способ позволяет продукцию антител и фрагментов антител с аффинностью приблизительно 10^{-9} М или менее.

Скрининг библиотек можно проводить различными способами, известными в данной области. Например, CD79b можно использовать для нанесения на лунки адсорбционных планшетов, экспрессировать на клетках-хозяевах, фиксированных на адсорбционных планшетах или использовать в сортировке клеток, или конъюгировать с биотином для улавливания покрытыми стрептавидином гранулами, или использовать в любом способе пэннинга библиотек фагового дисплея.

Образцы для фагового дисплея подвергают контактированию с иммобилизованным CD79b в условиях, подходящих для связывания по меньшей мере части фаговых частиц с адсорбентом. Обычно выбирают, условия, включая pH, ионную силу, температуру и т.п., имитирующие физиологические условия. Фаги, связанные с твердой фазой, промывают, а затем элюируют кислотой, например, как описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), или щелочью, например, как описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или посредством конкуренции с антигеном CD79b, например в способе, сходным со способом конкуренции с антигеном в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). За один раунд селекции фаги можно обогащать в 20-1000 раз. Более того, обогащенные фаги можно выращивать в бактериальной культуре и подвергать последующим раундам селекции.

Эффективность селекции зависит от множества факторов, включая кинетику диссоциации при промывании, и возможность одновременной встречи множества фрагментов антител на одном фаге с антигеном. Антитела с быстрой кинетикой диссоциации (и слабой аффинностью связывания) можно задерживать с использованием короткого промывания, поливалентного фагового дисплея и высокой плотностью нанесения антигена на твердую фазу. Высокая плотность не только стабилизирует фаг при поливалентных взаимодействиях, но также способствует повторному связыванию фага, который диссоциировал. Селекция антител с низкой кинетикой диссоциации (и высокой аффинностью связывания) можно обеспечивать, используя длительные промывания и одновалентный фаговый дисплей, как описано в Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) и в WO 92/09690, и низкую плотность нанесения антигена, как описано в Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

Селекцию между фаговыми антителами с различной аффинностью к CD79b можно проводить даже при аффинности, которая отличается немного. Однако, случайная мутация выбранного антитела (например, как происходит в некоторых способах созревания аффинности) может привести к возникновению многих мутантов,

большинство из которых связываются с антигеном, и немногие из которых обладают более высокой аффинностью. При ограничении CD79b, редкий высокоаффинный фаг может быть конкурентно устранен. Для сохранения всех мутантов с более высокой аффинностью, фаги можно инкубировать с избытком биотинилированного CD79b, но с биотинилированным CD79b в концентрации с более низкой молярностью, чем предполагаемая молярная аффинность, постоянная для CD79b. Затем связывающиеся с высокой аффинностью фаги можно улавливать покрытыми стрептавидином парамагнитными гранулами. Такое "равновесное улавливание" позволяет селекцию антител согласно их аффинности связывания, с чувствительностью, которая позволяет выделить мутантных клонов с аффинностью, большей только в два раза, из большого избытка фагов с более низкой аффинностью. Также можно изменять условия, используемые для промывания фагов, связанных с твердой фазой, для различения на основе кинетики диссоциации.

Клоны, направленные против CD79b, можно отбирать на основе активности. В определенных вариантах осуществления, изобретение относится к антителам против CD79b, которые связываются с живыми клетками, которые естественным образом экспрессируют CD79b. В одном варианте осуществления, изобретение относится к антителам против CD79b, которые блокируют связывание между лигандом CD79b и CD79b, но не блокируют связывание между лигандом CD79b и вторым белком. Клоны Fv, соответствующие таким антителам против CD79b, можно подвергать селекции посредством (1) выделения клонов, направленных против CD79b, из фаговой библиотеки, как описано выше, и необязательно размножения выделенной популяции фаговых клонов путем выращивания популяции в подходящем бактериальном хозяине; (2) селекции CD79b и второго белка, против которого является желательной блокирующая и неблокирующая активность, соответственно; (3) адсорбции фаговых клонов, направленных против CD79b, на иммобилизованный CD79b; (4) применения избытка второго белка для элюирования каких-либо нежелательных клонов, которые распознают связывающие CD79b детерминанты, которые перекрываются или являются общими со связывающими детерминантами второго белка; и (5) элюирования клонов, которые остаются адсорбированными после стадии (4). Необязательно, клоны с требуемыми блокирующими/неблокирующими свойствами можно далее обогащать путем повторения процессов селекции, описанных в настоящем документе, один или несколько раз.

ДНК, кодирующую образованные из гибридомы моноклональные антитела или клоны Fv фагового дисплея по изобретению, легко выделять и секвенировать с использованием общепринятых способов (например с использованием олигонуклеотидных праймеров, сконструированных для специфичной амплификации представляющих интерес кодирующих участков тяжелой и легкой цепей из гибридомы или ДНК-матрицы фага). После выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомяка (CHO), или клетки миеломы, которые в ином случае не продуцируют белок иммуноглобулина, обеспечивая синтез требуемых моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 (1992).

ДНК, кодирующую клоны Fv по изобретению можно комбинировать с известными последовательностями ДНК, кодирующими константные участки тяжелой цепи и/или легкой цепи (например, соответствующие последовательности ДНК можно получать

в соответствии с Kabat et al., выше) с образованием клонов, кодирующих полноразмерные или неполные тяжелые и/или легкие цепи. Будет понятно, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать от человека или из любого вида животных. Клон Fv, образованный из ДНК переменного домена одного вида животных (такого как человек), а затем слитый с ДНК константной области другого вида животных с образованием кодирующей последовательности(ей) "гибридной" полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, включен в определение "химерного" и "гибридного" антитела, как используют в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления, клон Fv, образованный из ДНК переменной области человека, является слитым с ДНК константной области человека с образованием кодирующей последовательности(ей) для полноразмерной или неполной тяжелой и/или легкой цепей.

ДНК, кодирующую антитело против CD79b, происходящую из гибридомы, также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательности константными доменами тяжелой и легкой цепей вместо гомологичных последовательностей мыши, происходящих из клона гибридомы (например, как в способе Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующую происходящее из гибридомы или Fv-клона антитело или фрагмент, далее можно модифицировать ковалентным связыванием с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей кодирующей последовательности не являющегося иммуноглобулином полипептида, или ее части. Таким образом, получают "химерные" или "гибридные" антитела, которые обладают специфичностью связывания происходящих из Fv-клона или клона гибридомы антител по изобретению.

С. Антителозависимая опосредуемая ферментом пролекарственная терапия (ADEPT)

Антитела по настоящему изобретению также можно использовать в ADEPT путем конъюгации антитела с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидильное химиотерапевтическое средство, см. WO81/01145) в активное лекарственное средство против злокачественной опухоли. См., например, WO 88/07378 и патент США No. 4975278.

Ферментный компонент иммуноконъюгата, подходящий для ADEPT, включает любой фермент, способный действовать на пролекарство таким образом, чтобы превращать его в более активную цитотоксическую форму.

Ферменты, которые являются подходящими в способе по этому изобретению, включают, но не ограничиваются ими, щелочную фосфатазу, подходящую для превращения фосфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, подходящую для превращения сульфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминазу, подходящую для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в лекарственное средство против злокачественной опухоли, 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза *serratia*, термоллизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые пригодны для превращения пептид-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, подходящие для превращения пролекарств, которые содержат заместители в виде D-аминокислот; расщепляющие углевод ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, подходящие для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β -лактамазу, подходящую для превращения лекарственных средств, преобразованных в производное с β -лактамами, в свободные лекарственные средства; и пенициллинамидазы, такие как амидаза

пенициллина V или амидаза пенициллина G, подходящие для превращения лекарственных средств, преобразованных в производное по их азотам аминогрупп посредством феноксиацетильной или фенилацетильной групп, соответственно, в свободные лекарственные средства. Альтернативно антитела с ферментативной активностью, также известные в данной области как "абзимы", можно использовать для превращения пролекарств по изобретению в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Конъюгаты антитело-абзим можно получать, как описано в настоящем документе, для доставки абзима в популяцию опухолевых клеток.

Ферменты по этому изобретению можно ковалентно связывать с антителами против CD79b способами, известными в данной области, такими как применение гетеробифункциональных реагентов для сшивания, рассмотренных выше. Альтернативно слитые белки, содержащие по меньшей мере антиген-связывающую область антитела по изобретению, связанную по меньшей мере с функционально активной частью фермента по изобретению, можно конструировать с использованием способов рекомбинантных ДНК, хорошо известных в данной области (см., например, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)).

D. Антитело против CD79b

В дополнение к антителам против CD79b, описанным в настоящем документе, предусматривается, что можно получать варианты антител против CD79b. Варианты антител против CD79b можно получать посредством внесения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующую ДНК, и/или посредством синтеза требуемого антитела или полипептида. Специалисты в данной области поймут, что аминокислотные изменения могут изменять посттрансляционные процессы антитела против CD79b, например, они могут изменять количество или положение участков гликозилирования или изменять характеристики заякоривания на мембране.

Изменения антител против CD79b, описанных в настоящем документе, можно проводить, например, с использованием любого из способов и руководств для консервативных и неконсервативных мутаций, указанных, например, в патенте США No. 5364934. Изменение может представлять собой замену, делецию или вставку одного или нескольких кодонов, кодирующих антитело или пептид, которые приводят к изменению аминокислотной последовательности по сравнению с нативным антителом или полипептидом. Необязательно изменение представляет собой замену по меньшей мере одной аминокислоты другой аминокислотой в одном или нескольких доменах антител против CD79b. Информацию о том, какой аминокислотный остаток может быть вставлен, замещен или удален без неблагоприятного влияния на требуемую активность, можно найти посредством сравнения последовательности антитела против CD79b с последовательностью гомологичной известной белковой молекулы и минимизации количества замен аминокислотной последовательности в участках высокой гомологии. Аминокислотные замены могут быть результатом замены одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные структурные и/или химические свойства, такой как замена лейцина серином, т.е., они могут представлять собой консервативные аминокислотные замены. Размер вставок, делеций или замен необязательно может находиться в диапазоне приблизительно от 1 до 5 аминокислот. Допустимое изменение можно определять систематическим проведением вставок, делеций или замен аминокислот в последовательности и тестированием полученных вариантов в отношении активности, проявляемой полноразмерной или зрелой нативной последовательностью.

В настоящем документе предусмотрены фрагменты антител против CD79b. Такие фрагменты могут быть укорочены с N-конца или C-конца, или они могут быть лишены внутренних остатков, например, по сравнению с полноразмерным нативным антителом или белком. Такие фрагменты лишены аминокислотных остатков, которые не являются

необходимыми для требуемой биологической активности антител против CD79b. Фрагменты антител против CD79b можно получать любым из множества общепринятых способов. Требуемые пептидные фрагменты можно химически синтезировать. Альтернативный подход вовлекает получение антитела или полипептидных фрагментов ферментативным расщеплением, например, посредством обработки белка ферментом, о котором известно, что он расщепляет белки в областях, определяемых конкретными аминокислотными остатками, или посредством расщепления ДНК подходящими ферментами рестрикции и выделения требуемого фрагмента. Другой подходящий способ вовлекает выделение и амплификацию фрагмента ДНК, кодирующего требуемое антитело или полипептидный фрагмент, посредством

полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве 5' и 3'-праймеров в ПЦР используют олигонуклеотиды, которые определяют концы фрагмента ДНК. Предпочтительно фрагменты антител против CD79b имеют по меньшей мере один вид биологической и/или иммунологической активности, совпадающий с видами активности нативного антитела против CD79b, описанного в настоящем документе.

В конкретных вариантах осуществления, представляющие интерес консервативные замены представлены в таблице 6 под заголовком "Предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда вносят более существенные изменения, обозначаемые в таблице 6 "иллюстративными заменами", или как описано ниже в отношении классов аминокислот, и проводят скрининг

Таблица 6

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; норлейцин	leu
Leu (L)	норлейцин; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; норлейцин	leu

Существенные модификации функции или иммунологических свойств антитела против CD79b проводят, выбирая замены, которые значительно отличаются по их эффекту на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, такой

как конформация в виде слоя или спирали, (b) заряда или гидрофобности молекулы в участке-мишени, или (c) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки можно разделить на группы на основе общих свойств их боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
- (3) кислые: asp, glu;
- (4) основные: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) остатки, влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены вовлекают замену члена одного из этих классов членом из другого класса. Такие замещенные остатки также можно вносить в участки консервативных замен или, более предпочтительно, в остальные (неконсервативные) участки.

Изменения можно проводить с использованием способов, известных в данной области, таких как опосредуемый олигонуклеотидом (сайт-направленный) мутагенез, сканирование аланином и мутагенез посредством ПЦР. Сайт-направленный мутагенез (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), кассетный мутагенез (Wells et al., Gene. 34:315 (1985)), мутагенез с рестрикцией-селекцией (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)) или другие известные способы можно проводить на клонированной ДНК с получением ДНК варианта антитела против CD79b.

Для идентификации одной или нескольких аминокислот вдоль непрерывной последовательности можно использовать анализ сканирования аминокислотами. К предпочтительным сканирующим аминокислотам относятся относительно небольшие нейтральные аминокислоты. Такие аминокислоты включают аланин, глицин, серин и цистеин. Аланин, как правило, является предпочтительной сканирующей аминокислотой в этой группе, поскольку она устраняет боковую цепь кроме бета-углерода и с меньшей вероятностью изменит конформацию основной цепи варианта [Cunningham and Wells, Science. 244: 1081-1085 (1989)]. Также аланин обычно является предпочтительным, поскольку он представляет собой наиболее распространенную аминокислоту. Кроме того, он часто встречается как в углубленных, так и в экспонированных, положениях [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Если замена аланином не приводит к достаточным количествам варианта, можно использовать изотерную аминокислоту.

Любой остаток цистеина, не вовлеченный в поддержание надлежащей конформации антитела против CD79b, также можно заменять, главным образом, серином, повышая стабильность молекулы к окислению и препятствуя aberrантному поперечному сшиванию. Напротив, для повышения стабильности, в такую молекулу можно вносить цистеиновую связь(и) (в частности где антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Особенно предпочтительный тип варианта с заменами включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный вариант (ы), выбранный для дальнейшей разработки, будет обладать улучшенными биологическими свойствами относительно исходного антитела, из которого они получены. Удобный способ получения таких вариантов с заменами включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. В кратком изложении несколько областей гипервариабельного участка (например, 6-7 областей) подвергают мутации

с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом участке. Полученные таким образом варианты антитела экспонируют в качестве одновалентных антител из частиц нитевидных фагов в качестве молекул, слитых с продуктом гена III M13 и упакованных в каждую частицу. Затем экспонированные на фаге варианты подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания), как описано в настоящем документе. В целях идентификации областей гипервариабельного участка-кандидата для модификации, можно проводить сканирующий аланином мутагенез, идентифицируя остатки гипервариабельного участка, участвующие в значительной степени в связывании антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть целесообразным анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело в целях идентификации точек контакта между антителом и полипептидом CD79b. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. После получения таких вариантов, панель вариантов подвергают скринингу, как описано в настоящем документе, и антитела с наилучшими свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах можно отбирать для дальнейшей разработки.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела против CD79b, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение олигонуклеотид-опосредуемым (или сайт-направленным) мутагенезом, мутагенезом посредством ПЦР, и кассетным мутагенезом последовательности ранее полученного варианта или не являющейся вариантом версии антитела против CD79b.

Е. Модификации антител против CD79b

В объем этого изобретения включены ковалентно модифицированные антитела против CD79b. Один тип ковалентной модификации включает проведение реакции заданных аминокислотных остатков антител против CD79b с органическим образующим производное веществом, которое способно реагировать с определенными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками таких антител против CD79b. Подходящим является преобразование бифункциональными веществами, например, для поперечного сшивания антитела против CD79b с нерастворимой в воде матрицей подложки или поверхностью для применения в очистке антител против CD79b, и наоборот. Обычно используемые поперечно-сшивающие вещества включают, например, 1,1-бис (диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, например, сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дителиобис(сукцинимидилпропионат), бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан, и такие вещества, как метил-3-[(п-азидофенил)дителио]пропиоимидат.

Другие модификации включают дезамидацию глутаминильных и аспарагинильных остатков до соответствующих глутаминильных и аспартильных остатков, соответственно, гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серинильных и треонинильных остатков, метилирование α -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], ацетилирование N-концевого амина и амидацию любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации антител против CD79b включает изменение

нативного паттерна гликозилирования антитела или полипептида. "Изменение нативного паттерна гликозилирования" определяют как удаление одной или нескольких углеводных групп, встречающихся в нативной последовательности антитела против CD79b (либо посредством удаления основного участка гликозилирования, либо посредством

5 устранения гликозилирования химическими и/или ферментативными способами), и/или добавление одного или нескольких участков гликозилирования, которые не присутствуют в нативной последовательности антитела против CD79b. Кроме того, это выражение включает количественные изменения гликозилирования нативных белков, вовлекающие изменение структуры и соотношений различных присутствующих

10 углеводов групп.

Гликозилирование антител и других полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет

15 собой любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности, распознаваемые для ферментативного присоединения углеводной группы к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного

20 из сахаров, представляющих собой N-ацетилгалактозамин, галактозу или ксилозу, к гидроксикаминокислоте, обычно, к серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление участков гликозилирования к антителу против CD79b удобно проводить, изменяя аминокислотную последовательность, чтобы она содержала одну или несколько

25 из описанных выше трипептидных последовательностей (для участков N-связанного гликозилирования). Также изменение можно проводить посредством добавления к последовательности или замены посредством одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела против CD79b. Аминокислотную последовательность антитела против CD79b необязательно можно изменять посредством

30 изменений на уровне ДНК, в частности, посредством мутации ДНК, кодирующей последовательность антитела против CD79b, в предварительно выбранных основаниях, чтобы получить кодоны, которые будут транслировать требуемые аминокислоты.

Другим способом увеличения количества углеводных групп на антителе против CD79b является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к

35 полипептиду. Такие способы описаны в данной области, например, в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 года, и в Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem. pp. 259-306 (1981).

Удаление углеводных групп, присутствующих на антителе против CD79b, можно проводить химически или ферментативно или посредством мутационного замещения

40 кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, которые служат в качестве мишеней для гликозилирования. Химические способы дегликозилирования известны в данной области и описаны, например, Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987) и Edge et al., Anal. Biochem. 118:131 (1981). Ферментативное отщепление углеводных групп на полипептидах можно проводить с использованием множества эндо- и экзогликозидаз,

45 как описано Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Другой тип ковалентной модификации антитела против CD79b включает связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем (PEG), полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, способом, указанным в

патентах США No. 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Антитело также можно заключать в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или межфазной полимеризации (например, микрокапсулы на основе гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы на основе

5 полиметилметакрилата, соответственно), в коллоидные системы для доставки лекарственного средства (например, липосомы, микросферы на основе альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы), или в микроэмульсии. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Science, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Антитело против CD79b по настоящему изобретению также можно модифицировать
10 таким образом, чтобы образовывались химерные молекулы, содержащие антитело против CD79b, слитые с другим гетерологичным полипептидом или аминокислотной последовательностью.

В одном варианте осуществления такая химерная молекула содержит антитело против CD79b, слитое с полипептидом-меткой, который обеспечивает эпитоп, с которым
15 может селективно связываться антитело против метки. Эпитоп-метку, как правило, помещают на N- или C-конец антитела против CD79b. Детекцию присутствия таких меченых эпитопом форм антител против CD79b можно проводить с использованием антитела против полипептида-метки. Также предоставление эпитопа-метки обеспечивает простоту очистки антитела против CD79b способами аффинной очистки с
20 использованием антитела против метки или другого типа аффинной матрицы, которая связывается с эпитопом-меткой. Различные полипептиды-метки и соответствующие антитела к ним хорошо известны в данной области. Их примеры включают метки полигистидина (poly-his) или поли-гистидин-глицина (poly-his-gly); полипептид-метку flu HA и антитело к нему 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; метку с-
25 тус и антитела к ней 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; и метку в виде гликопротеина D (gD) вируса простого герпеса и антитело к ней [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Другие полипептиды-метки включают Flag-пептид [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; пептид-эпитоп KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; пептид-эпитоп α -
30 тубулина [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; и пептидную метку белка гена 10 T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

В альтернативном варианте осуществления химерная молекула может содержать антитело против CD79b, слитое с иммуноглобулином или конкретной областью иммуноглобулина. Для двухвалентной формы химерной молекулы (также обозначаемой
35 как "иммуноадгезин"), такое слияние может быть с Fc-областью молекулы IgG. Слияние молекул Ig предпочтительно включает замену растворимой (удаленный или инактивированный трансмембранный домен) формой антитела против CD79b по меньшей мере одного вариабельного участка в молекуле Ig. В особенно предпочтительном варианте осуществления, слитая молекула иммуноглобулина
40 включает шарнирную область, CH₂ и CH₃, или шарнирную область, CH₁-, CH₂- и CH₃-участки молекулы IgG1. Для получения слитых молекул иммуноглобулином также см. патент США No. 5428130, выданный 27 июня 1995 года.

Е. Получение антител против CD79b

Представленное ниже описание относится, главным образом, к получению антител
45 против CD79b посредством культивирования клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против CD79b. Безусловно, предусматривается, что для получения таких антител против CD79b можно использовать альтернативные способы, которые хорошо

известны в данной области. Например, соответствующую аминокислотную последовательность, или ее части, можно получать прямым пептидным синтезом с использованием твердофазных способов [см., например, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. Синтез белков *in vitro* можно проводить с использованием ручных способов или с помощью автоматов. Автоматизированный синтез можно проводить, например, с применением Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) с использованием инструкций изготовителя. Различные части антитела против CD79b можно химически синтезировать по отдельности и комбинировать с использованием химических или ферментативных способов с получением требуемого антитела против CD79b.

1. Выделение ДНК, кодирующей антитело против CD79b ДНК, кодирующую антитело против CD79b, можно получать из библиотеки кДНК, полученной из ткани, предположительно обладающей мРНК антитела против CD79b, и экспрессирующей ее на поддающемся детекции уровне. Таким образом, ДНК антитела против CD79b человека, можно удобным образом получать из библиотеки кДНК, полученной из ткани человека. Ген, кодирующий антитело против CD79b, также можно получать из геномной библиотеки или известными способами синтеза (например, автоматизированным синтезом нуклеиновой кислоты).

Библиотеки можно подвергать скринингу с помощью зондов (таких как олигонуклеотиды по меньшей мере приблизительно из 20-80 оснований), предназначенных для идентификации представляющего интерес гена или кодируемого им белка. Скрининг кДНК или геномной библиотеки определенным зондом можно проводить с использованием стандартных способов, как описано в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Альтернативным способом выделения гена, кодирующего антитело против CD79b является применение технологии ПЦР [Sambrook et al., выше; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Способы скрининга библиотеки кДНК хорошо известны в данной области. Последовательности олигонуклеотидов, отобранные в качестве зондов, должны обладать достаточной длиной и должны быть достаточно уникальными, чтобы минимизировать ложноположительные результаты. Предпочтительно олигонуклеотид является меченым, чтобы его можно было выявить при гибридизации с ДНК в библиотеке, подвергаемой скринингу. Способы мечения хорошо известны в данной области и включают применение радиоактивных меток, таких как меченный ³²P АТР, биотинилирование или мечение ферментом. Условия гибридизации, включая условия умеренной жесткости и высокой жесткости, представлены в Sambrook et al., выше.

Последовательности, идентифицированные в таких способах скрининга библиотек, можно сравнивать и выравнивать с другими известными последовательностями, депонированными и доступными в общедоступных базах данных, таких как GenBank или другие частные базы данных последовательностей. Идентичность последовательностей (на уровне либо аминокислот, либо нуклеотидов) в определенных участках молекулы или на протяжении полноразмерной последовательности можно определять с использованием способов, известных в данной области и как описано в настоящем документе.

Нуклеиновую кислоту, имеющую кодирующую белок последовательность, можно получать скринингом определенных библиотек кДНК или геномных библиотек с использованием установленной аминокислотной последовательности, описанной в настоящем документе впервые, и, если необходимо, с использованием общепринятых

способов удлинения праймеров, как описано в Sambrook et al., выше, для детекции предшественников и промежуточных форм при процессинге мРНК, которые могут не подвергаться обратной транскрипции в кДНК.

2. Выбор и трансформация клеток-хозяев

5 Клетки-хозяева трансфицируют или трансформируют экспрессирующими или клонирующими векторами, описанными в настоящем документе, для продукции антитела против CD79b и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Условия

10 культивирования, такие как среды, температура, pH и т.п., квалифицированный специалист может выбрать без излишнего экспериментирования. Как правило, принципы, протоколы и практические способы для максимизации продуктивности клеточных культур можно найти в Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) и Sambrook et al., выше.

15 Способы трансфекции эукариотических клеток и трансформации прокариотических клеток, под которыми понимают введение ДНК в клетку, таким образом, чтобы ДНК реплицировалась, либо экстрахромосомным, либо хромосомным интегрированием, известны специалисту в данной области, например, опосредуемый CaCl_2 , CaPO_4 , липосомами способ и электропорация. В зависимости от используемой клетки-хозяина,

20 трансформацию проводят с использованием стандартных способов, подходящих для таких клеток. Обработку кальцием с использованием хлорида кальция, как описано в Sambrook et al., выше, или электропорацию, как правило, используют для прокариот. Для трансформации определенных клеток растений используют инфицирование посредством *Agrobacterium tumefaciens*, как описано в Shaw et al., Gene. 23:315 (1983) и

25 WO 89/05859, опубликованной 29 июня 1989 года. Для клеток млекопитающих без таких клеточных стенок можно использовать способ осаждения фосфатом кальция по Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Основные аспекты трансфекций систем клеток-хозяев млекопитающих описаны в патенте США No. 4399216. Трансформации дрожжей, как правило, проводят в соответствии со способом Van Solingen et al., J. Bact, 130:946

30 (1977) и Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Однако также можно использовать другие способы введения ДНК в клетки, например, посредством микроинъекции в ядро, электропорации, слияния протопласта бактерий с интактными клетками, или поликатионов, например, полибрена, полиорнитина. Для различных способов трансформации клеток млекопитающих, см. Keown et al., Methods in Enzymology,

35 185:527-537 (1990) и Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторы, представленные в настоящем документе, включают клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот.

а. Прокариотические клетки-хозяева

40 Подходящие прокариоты включают, но не ограничиваются ими эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как *E. coli*. Различные штаммы *E. coli* являются общедоступными, такие как *E. coli* K12 штамм MM294 (ATCC 31446); *E. coli* X1776 (ATCC 31537); *E. coli* штамм W3110 (ATCC 27325) и K5 772 (ATCC 53635). Другие подходящие

45 прокариотические клетки-хозяева включают Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonellatyphimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41P, описанная в DD

266710, опубликованной 12 апреля 1989 года), *Pseudomonas*, такие как *P. Aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* и *Streptomyces*. Эти примеры являются иллюстративными, но не ограничивающими. Штамм W3110 является одним особенно предпочтительным хозяином или родителем, поскольку он представляет собой распространенный штамм-хозяин для ферментации продукта рекомбинантной ДНК. Предпочтительно, клетка-хозяин секретирует минимальные количества протеолитических ферментов. Например, штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; номер депонированного образца ATCC No. 27325) можно модифицировать для достижения генетической мутации в генах, кодирующих белки, эндогенные для хозяина, примеры таких хозяев включают *E. coli* W3110 штамм 1A2, который имеет полный генотип *tonA*; *E. coli* W3110 штамм 9E4, который имеет полный генотип *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 штамм 27C7 (ATCC 55244), который имеет полный генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ampT kan^r*; *E. coli* W3110 штамм 37D6, который имеет полный генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 штамм 40B4, который представляет собой штамм 37D6 с делеционной мутацией *degP* без устойчивости к канамицину; *E. coli* W3110 штамм 33D3, имеющий генотип W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lacIqlacL8 \Delta ompT \Delta (nmpc-fepE) degP41kan^R* (патент США No. 5639635) и штамм *E. coli*, имеющий мутантную периплазматическую протеазу, описанную в патенте США No. 4946783, выданном 7 августа 1990 года. Также подходят другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Все эти примеры являются иллюстративными, но не ограничивающими. Способы конструирования производных любой из указанных выше бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области и описаны, например, в Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990). Как правило, необходимо выбирать соответствующие бактерии, учитывая способность к репликации репликона в клетках бактерий. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* можно подходящим образом использовать в качестве хозяев, когда для предоставления репликона используют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и может быть желательным добавление в клеточную культуру дополнительных ингибиторов протеаз. Альтернативно подходят способы клонирования *in vitro*, например, ПЦР или другие полимеразные реакции нуклеиновых кислот.

Полноразмерное антитело, фрагменты антитела и слитые белки антитела можно продуцировать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не требуются, например, когда терапевтическое антитело конъюгировано с цитотоксическим средством (например, токсином) и сам иммуноконъюгат демонстрирует эффективность в отношении разрушения опухолевых клеток. Полноразмерные антитела обладают более длительным временем полужизни в кровотоке. Продукция в *E. coli* является более быстрой и более экономичной. Для экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях, см., например, U.S. 5648237 (Carter et. al), U.S. 5789199 (Joly et al) и U.S. 5840523 (Simmons et al.) в которых описаны участок инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции, эти патенты включены в настоящий документ в качестве ссылок. После экспрессии антитело выделяют из клеточной массы *E. coli* в растворимой фракции, и его можно очищать, например, посредством колонки с белком А или G, в зависимости от изоформа. Конечную очистку можно проводить аналогично

процессу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках CHO.

в. Эукариотические клетки-хозяева

В дополнение к прокариотам, подходящими хозяевами для клонирования и экспрессии векторов, кодирующих антитело против CD79b являются эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи. Часто используют низший эукариотический микроорганизм-хозяин *Saccharomyces cerevisiae*. Другие хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139383, опубликованный 2 мая 1985 года); хозяева *Kluyveromyces* (патент США No. 4943529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)), например, такие как *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol. 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*, *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*, *Trichoderma reesei* (EP 244234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538, опубликованный 31 октября 1990 года); и нитчатые грибы, например, такие как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, опубликованная 10 января 1991 года), и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene. 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 1470-1474 [1984]) и *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J. 4:475-479 [1985]). Для этого пригодны метилотропные дрожжи и они включают, но не ограничиваются ими, дрожжи, способные расти на метаноле, выбранные из родов, состоящих из *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Rhodotorula*. Перечень конкретных видов, которые являются примерами этого класса дрожжей, можно найти в С. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного анти-CD79b антитела получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки насекомых, таких как *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9, а также клетки растений, таких как культуры хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака. Было идентифицировано большое число бакуловирусных штаммов, их варианты и соответствующие разрешенные клетки-хозяева, такие как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Доступны различные вирусные штаммы для трансфекции, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут использоваться в качестве вирусов по настоящему изобретению, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Однако наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культура тканей) стало общепринятым способом. Примерами подходящих клеточных линий млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия почки эмбриона человека (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки детенышей хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34);

клетки печени крысы буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими или клонирующими векторами для продукции антитела против CD79b и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных подходящим образом для индукции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

3. Выбор и применение реплицируемого вектора

Для рекомбинантной продукции антитела по изобретению нуклеиновую кислоту (например, кДНК или геномную ДНК), кодирующую его, выделяют и встраивают в реплицируемый вектор для последующего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, легко выделяют и секвенируют с

использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Доступно множество векторов. Выбор вектора зависит, частично, от клетки-хозяина, подлежащей применению. Как правило, предпочтительные клетки-хозяева имеют либо прокариотическое, либо эукариотическое (как правило из млекопитающих) происхождение.

Например, вектор может быть представлен в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага. Соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты можно встраивать в вектор множеством способов. Как правило, ДНК встраивают в соответствующий участок(ки) для эндонуклеазы рестрикции с использованием способов, известных в данной области. Компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими, одну или несколько сигнальных последовательностей, ориджин репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. При конструировании подходящих векторов, содержащих один или несколько из этих компонентов, используют стандартные способы лигирования, которые известны квалифицированному специалисту.

CD79b можно продуцировать рекомбинантными способами не только прямо, но также в качестве полипептида, слитого с гетерологичным полипептидом, который может представлять собой сигнальную последовательность, или другим полипептидом, имеющим определенный участок расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Как правило, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора, или она может быть частью ДНК, кодирующей антитело против CD79b, которую встраивают в вектор. Сигнальная последовательность может представлять собой прокариотическую сигнальную последовательность, выбранную, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II. В случае секреции в дрожжах, сигнальная последовательность может представлять собой, например, лидерную последовательность инвертазы дрожжей, лидерную последовательность альфа-фактора (включая лидерные последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*, последняя из которых описана в патенте США No. 5010182) или лидерную последовательность кислой фосфатазы, лидерную последовательность глюкоамилазы *C. albicans* (EP 362179, опубликованный 4 апреля 1990 года) или сигнальную последовательность, описанную в WO 90/13646, опубликованной 15 ноября 1990 года. При экспрессии в клетках млекопитающих, для направления секреции белка можно

использовать сигнальные последовательности млекопитающих, такие как сигнальные последовательности из секретируемых полипептидов того же или родственного вида, а также вирусные секреторные лидерные последовательности.

а. Прокариотические клетки-хозяева

5 Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела по изобретению, можно получать с использованием стандартных рекомбинантных способов. Требуемые полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из антителопродуцирующих клеток, таких как клетки гибридомы. Альтернативно полинуклеотиды можно синтезировать с использованием
10 устройства для синтеза нуклеотидов или способами ПЦР. После получения, последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в рекомбинантный вектор, способный реплицировать и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. Для целей настоящего изобретения можно использовать множество векторов, которые доступны и известны в данной области. Выбор
15 соответствующего вектора зависит, главным образом, от размера нуклеиновых кислот, подлежащих встраиванию в вектор, и конкретной клетки-хозяина, подлежащей трансформации с помощью вектора. Каждый вектор содержит различные компоненты, в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида, или обе из них) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином,
20 в которой он находится.

Как правило, применительно к этим хозяевам используют плазмидные векторы, содержащие репликон и последовательности контроля из видов, совместимых с клеткой-хозяином. Как экспрессирующие, так и клонирующие векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает репликацию вектора
25 в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах, а также маркерные последовательности, которые способны обеспечивать фенотипическую селективность трансформированных клеток. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Ориджин репликации из плазмиды pBR322, которая содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину
30 (Tet) и, таким образом, обеспечивает простые способы идентификации трансформированных клеток, является подходящим для большинства грамотрицательных бактерий, плазмидный ориджин 2μ пригоден для дрожжей, и различные вирусные ориджины (SV40, полиомы, аденовирусы, VSV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. pBR322, ее производные, или
35 другие плазмиды микроорганизмов или бактериофаги также могут содержать, или быть модифицированными, чтобы они содержали, промоторы, которые могут использоваться микроорганизмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, используемые для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в Carter et al., патент США No. 5648237.

40 Кроме того, применительно к этим хозяевам, в качестве трансформируемых векторов можно использовать фаговые векторы, содержащие репликон и последовательности контроля, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином. Например, при получении рекомбинантного вектора можно использовать бактериофаг, такой как λGEM.TM.-11, который можно использовать для трансформации восприимчивых к нему клеток-хозяев,
45 таких как *E. coli* LE392.

Экспрессирующий вектор по изобретению может содержать две или более пар промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность,

расположенную выше (5') цистрона, которая модулирует его экспрессию.

Прокариотические промоторы, как правило, относятся к одному из двух классов: индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует повышение уровней транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменение условия культивирования, например на наличие или отсутствие питательных веществ или изменение температуры.

Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор можно функционально связывать с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из ДНК, являющейся его источником, посредством расщепления ферментом рестрикции и встраивания выделенной последовательности промотора в вектор по изобретению. Для направления амплификации и/или экспрессии генов-мишеней можно использовать как нативную промоторную последовательность, так и множество гетерологичных промоторов. В некоторых вариантах осуществления используют гетерологичные промоторы, поскольку они позволяют более высокую транскрипцию и более высокий выход экспрессируемого гена-мишени по сравнению с нативным промотором полипептида-мишени.

Хорошо известны промоторы, распознаваемые различными потенциальными клетками-хозяевами. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают промотор *PhoA*, промоторные системы β -галактамазы и лактозы [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], промоторную систему щелочной фосфатазы, триптофановую (*trp*) промоторную систему [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36776] и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)] или *trc*. Промоторы для применения в бактериальных системах также содержат последовательность Шайна-Дальгарно (*S.D.*), функционально связанную с ДНК, кодирующей антитело против CD79b. Однако также подходят другие промоторы, которые являются функциональными в бактериях (такие как другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности опубликованы, тем самым позволяя квалифицированному специалисту функционально лигировать их с цистронами, кодирующими требуемые легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) с использованием линкеров или адапторов для обеспечения каких-либо требуемых участков рестрикции.

В одном аспекте изобретения, каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент, представляющий собой секреторную сигнальную последовательность, который направляет перемещение экспрессированных полипептидов через мембрану. Как правило, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора, или она может быть частью ДНК полипептида-мишени, которую встраивают в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей этого изобретения, должна представлять собой последовательность, которая распознается клеткой-хозяином и подвергается процессингу (т.е. отщепляется сигнальной пептидазой) в ней. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не осуществляют процессинг сигнальных последовательностей, нативных для гетерологичных полипептидов, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irrp*, или термостабильного энтеротоксина II (*STII*), *LamB*, *PhoE*, *PeIB*, *OmpA* и *MBP*. В одном варианте осуществления изобретения, сигнальные последовательности, используемых в обоих цистронах

экспрессирующей системы представляют собой сигнальные последовательности STII или их варианты.

В другом аспекте продукция иммуноглобулинов по изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина, и, таким образом, она не требует присутствия секреторных сигнальных последовательностей в каждом цистроне. В этом отношении, легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов экспрессируются, сворачиваются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Определенные штаммы-хозяева (например, штаммы *trxB⁻ E. coli*) обеспечивают условия в цитоплазме, которые способствуют образованию дисульфидных связей, тем самым обеспечивая надлежащее сворачивание и сборку экспрессированных субъединиц белков. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Настоящее изобретение относится к экспрессирующей системе, в которой количественное отношение экспрессированных полипептидных компонентов можно модулировать для максимизации выхода секретированных и надлежащим образом свернутых антител по изобретению. Такое модулирование проводят по меньшей мере частично путем одновременного модулирования эффективности трансляции полипептидных компонентов.

Один способ модулирования эффективности трансляции описан в Simmons et al., патент США No. 5840523. В нем используются варианты участка инициации трансляции (TIR) в цистроне. Для данного TIR, можно создавать серию вариантов аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновых кислот с диапазоном эффективности трансляции, тем самым обеспечивая удобные инструменты в целях коррекции этого фактора для требуемого уровня экспрессии конкретной цепи. Варианты TIR можно получать общепринятыми способами мутагенеза, которые приводят к изменениям кодонов, которые могут изменять аминокислотную последовательность, хотя предпочтительными являются молчащие изменения нуклеотидной последовательности. Изменения TIR могут включать, например, изменения количества или размещения последовательностей Шайна-Дальгарно, вместе с изменениями сигнальной последовательности. Одним способом получения мутантных сигнальных последовательностей является получение "банка кодонов" в начале кодирующей последовательности, которые не изменяют аминокислотную последовательность в сигнальной последовательности (т.е., изменения являются молчащими). Это можно осуществлять изменением третьего нуклеотидного положения каждого кодона; кроме того, некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют несколько первых и вторых положений, что может усложнять получение банка. Этот способ мутагенеза подробно описан в Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

Предпочтительно, получают набор векторов с диапазоном эффективности TIR для каждого цистрона в них. Этот ограниченный набор обеспечивает сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также выход требуемых продуктов антитела при различных сочетаниях эффективности TIR. Эффективность TIR можно определять путем количественного определения уровня экспрессии репортерного гена, как подробно описано в Simmons et al., патент США No. 5840523. На основе сравнения эффективности трансляции, отбирают требуемые отдельные TIR, подлежащие комбинированию в конструкциях экспрессирующих векторов по изобретению.

б. Эукариотические клетки-хозяева

Компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими, один или несколько из следующих: сигнальная последовательность, ориджин репликации, один

или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

(1) Компонент - сигнальная последовательность

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине также может содержать 5 сигнальную последовательность или другой полипептид, обладающий участком для специфичного расщепления на N-конце зрелого белка или представляющего интерес полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность, которая распознается и преобразуется (т.е., расщепляется сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине. Для 10 экспрессии в клетках млекопитающих, доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD вируса простого герпеса.

ДНК для такого предшествующего участка лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитело.

15 *(2) Ориджин репликации*

Как правило, для экспрессирующих векторов млекопитающих компонент, представляющий собой ориджин репликации, не требуется. Например, как правило, можно использовать ориджин SV40, только потому, что он содержит ранний промотор.

(3) Компонент - ген селективного маркера

20 Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат ген для селекции, также называемый селективным маркером. Типичные гены для селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) комплементируют дефекты ауксотрофов или (с) обеспечивают основные питательные 25 вещества, которые не доступны из комплексных сред, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

В одном примере схемы селекции используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству и, 30 таким образом, выживают после режима селекции. Примерами такого доминантного вида селекции является применение лекарственных средств неомицина, микофеноловой кислоты и гиромидина.

Примером подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентификацию клеток, способных захватывать 35 нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против CD79b, такие как гены DHFR, тимидинкиназы, металлотионеина-I и -II, предпочтительно гены металлотионеина приматов, аденозиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы и т.д. Подходящей клеткой-хозяином, когда используется DHFR дикого типа, является клеточная линия CHO с дефицитом активности DHFR (например, ATCC CRL-9096), полученная и размноженная, 40 как описано Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Например, клетки, трансформированные геном для селекции DHFR, сначала идентифицируют культивированием всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Альтернативно, клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), 45 трансформированные или совместно трансформированные с последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать выращиванием клеток на среде, содержащей вещество для селекции по селективному маркеру, такое

как аминогликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США No. 4965199.

Подходящим геном для селекции для применения в дрожжах является ген *trp1*, находящийся в дрожжевой плазмиде YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. Ген *trp1* представляет собой селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, у которого отсутствует способность расти в отсутствие триптофана, например, ATCC No. 44076 или PER4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

(4) Промоторный компонент

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против CD79b для направления синтеза мРНК. Промоторы, распознаваемые множество потенциальных клеток-хозяев, хорошо известны.

Практически все эукариотические гены обладают АТ-богатой областью, расположенной приблизительно от 25 до 30 оснований выше участка инициации транскрипции. Другая последовательность, находящаяся от 70 до 80 оснований выше точки начала транскрипции множества генов, представляет собой участок CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления поли-А хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все из этих последовательностей можно встраивать в эукариотические экспрессирующие векторы.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения в дрожжевых хозяевах включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] или других гликолитических ферментов [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоза-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицеромутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкоизомераза и глюкокиназа.

Другие дрожжевые промоторы, которые представляют собой индуцибельные промоторы, обладающие дополнительным преимуществом контролируемой условиями выращивания транскрипции, представляют собой промоторные участки алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, ферментов деградации, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за употребление мальтозы и галактозы. Кроме того, подходящие векторы и промоторы для применения для экспрессии в дрожжах описаны в EP 73657.

Транскрипция антитела против CD79b с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, получаемыми из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц (UK 2211504, опубликованной 5 июля 1989), аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита-B и наиболее предпочтительно, вирус обезьяны 40 (SV40), гетерологичными промоторами млекопитающих, например, промотором актина или промотором иммуноглобулина, промоторами теплового шока, при условии, что такие промоторы являются совместимыми с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 обычно получают в качестве рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит ориджин репликации вируса SV40. Предранний промотор цитомегаловируса человека обычно получают в

качестве рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в хозяевах, относящихся к млекопитающим, с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в патенте США No. 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США No. 4601978. См. также Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) в отношении экспрессии кДНК β -интерферона человека в клетках мышей под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

(5) Компонент - энхансерный элемент

Транскрипцию ДНК, кодирующей антитело против CD79b, у высших эукариот можно повышать посредством встраивания в вектор энхансерной последовательности. Энхансеры представляют собой цис-регуляторные элементы ДНК, обычно приблизительно от 10 до 300 п.н., которые действуют на промотор, повышая его транскрипцию. Известно много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Их примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне ориджина репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне ориджина репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) в отношении энхансеров для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть присоединен в векторе к кодирующей антитело против CD79b последовательности в положении 5' или 3', однако предпочтительно он расположен в участке, расположенном в 5'-направлении от промотора.

(6) Компонент для терминации транскрипции

Экспрессирующие векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (в клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека, или содержащих ядро клетках из других многоклеточных организмов) также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно находятся на 5'- и, иногда, на 3'-нетранслируемых участках эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные фрагменты, транскрибируемые в качестве полиаденилированных фрагментов в нетранслируемом участке мРНК, кодирующей антитело против CD79b. Одним подходящим компонентом для терминации транскрипции является участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и описанный в ней экспрессирующий вектор.

Другие способы, векторы, и клетки-хозяева, подходящие для адаптации для синтеза антитела против CD79b в культуре рекомбинантных клеток позвоночных описаны в Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117060; и EP 117058.

4. Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для продукции антитела против CD79b согласно изобретению, можно культивировать в различных средах.

а. Прокариотические клетки-хозяева

Прокариотические клетки, используемые для получения полипептидов по изобретению, выращивают в средах, известных в данной области, и они подходят для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают бульон Луриа (LB) вместе с необходимыми питательными веществами. В некоторых вариантах осуществления, среда также содержит средство для селекции, выбранное,

исходя из конструкции экспрессирующего вектора, для селективного обеспечения роста прокариотических клеток, содержащих экспрессирующий вектор. Например, ампициллин добавляют в среду для выращивания клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину.

5 Также, помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, можно добавлять любые необходимые добавки в соответствующих концентрациях, добавляемые отдельно или в смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно, культуральная среда может содержать один или несколько восстановителей, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолята, дитиозритрита и дитиотреитола.

10 Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. Для роста *E. coli*, например, предпочтительная температура находится в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C, более предпочтительно от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C, более предпочтительно, она составляет 15 приблизительно 30°C. pH среды может быть любым в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 9, в зависимости, главным образом, от организма хозяина. Для *E. coli*, pH предпочтительно составляет от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4, и более предпочтительно приблизительно 7,0.

Если в экспрессирующем векторе по изобретению используют индуцибельный 20 промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте изобретения, для контроля транскрипции полипептидов используют промоторы PhoA. Таким образом, для индукции трансформированные клетки культивируют в среде с ограниченным содержанием фосфата. Предпочтительно, среда с ограниченным содержанием фосфата представляет собой среду C.R.A.P (см., 25 например, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Можно использовать множество других индуцирующих веществ, в соответствии с используемой векторной конструкцией, как известно в данной области.

В одном варианте осуществления, экспрессируемые полипептиды по настоящему изобретению секретируются в периплазму клетки-хозяина и из нее их выделяют. 30 Выделение белка, как правило, вовлекает разрушение микроорганизма, как правило, такими способами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток, клеточный дебрис или целые клетки можно удалять центрифугированием или фильтрацией. Кроме того, белки можно очищать, например, хроматографией с аффинной смолой. Альтернативно белки могут транспортироваться 35 в культуральную среду и могут быть выделены из нее. Клетки можно удалять из культуры и культуральный супернатант фильтровать и концентрировать для последующей очистки продуцированных белков. Экспрессированные полипептиды можно далее выделять и идентифицировать с использованием широко известных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блот 40 анализ.

В одном аспекте изобретения, продукцию антитела проводят в больших количествах путем процесса ферментации. Для продукции рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные способы ферментации с подпиткой. Крупномасштабная ферментация имеет емкость по меньшей мере 1000 литров, предпочтительно 45 приблизительно от 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах используются перемешивающие лопасти для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы (предпочтительного источника углерода/энергии). Мелкомасштабная ферментация относится, главным образом, к ферментации в ферментере, который имеет

емкость не более чем приблизительно 100 литров, и она может находиться в диапазоне от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров.

В процессе ферментации, индукцию экспрессии белка, как правило, начинают после того, как клетки вырастают в подходящих условиях до требуемой плотности, например, OD₅₅₀ приблизительно 180-220, на той стадии, когда клетки находятся в ранней стационарной фазе. Можно использовать различные индукторы в соответствии с используемой конструкцией вектора, как известно в данной области и как описано выше. Перед индукцией клетки можно выращивать в течение более коротких периодов времени. Клетки, как правило, индуцируют в течение приблизительно 12-50 часов, хотя можно использовать более длительную или более короткую индукцию.

Для повышения выхода продукции и качества полипептидов по изобретению, можно модифицировать различные условия ферментации. Например, для улучшения надлежащей сборки и сворачивания секретируемых полипептидов антитела, можно использовать дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и или DsbG) или FkpA (пептидилпролил-цис, транс-изомеразы с активностью шаперона) для котрансформации прокариотических клеток-хозяев. Было показано, что белки-шапероны способствуют надлежащему сворачиванию и растворимости гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) J Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou et al., патент США No. 6083715; Georgiou et al., патент США No. 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

Для минимизации протеолиза экспрессируемых гетерологичных белков (особенно белков, которые являются чувствительными к протеолизу), для настоящего изобретения можно использовать определенные штаммы-хозяева с дефицитом протеолитических ферментов. Например, штаммы клеток-хозяев можно модифицировать для обеспечения генетической мутации(ий) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их сочетания. Доступны некоторые штаммы *E. coli* с дефицитом протеаз и они описаны, например, в Joly et al. (1998), выше; Georgiou et al., патент США No. 5264365; Georgiou et al., патент США No. 5508192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

В одном варианте осуществления, в качестве клеток-хозяев в экспрессирующей системе по изобретению используют штаммы *E. coli* с дефицитом протеолитических ферментов и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или несколько белков-шаперонов.

б. Эукариотические клетки-хозяева

Для культивирования клеток-хозяев подходящими являются коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная поддерживающая среда ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), и среда Игла, модифицированная способом Дульбекко, ((DMEM), Sigma). Кроме того, для клеток-хозяев в качестве культуральной среды можно использовать любую из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США No. 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO9003430; WO 87/00195; или патенте США Re. 30985. Любые из этих сред можно дополнить при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как

лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно представленные в конечных концентрациях микромолярного диапазона) и глюкозой или эквивалентными источниками энергии. Также можно добавлять любые другие необходимые дополнительные вещества в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, которые ранее использовали для выбранных для экспрессии клеток-хозяев, и они будут понятны специалисту в данной области.

5. Детекция амплификации/экспрессии гена

Амплификацию и/или экспрессию гена можно определять непосредственно в образце, например, посредством общепринятого саузерн-блоттинга, нозарен-блоттинга для количественного определения транскрипции мРНК [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттинга (анализ ДНК), или гибридизации *in situ*, с использованием соответствующим образом меченого зонда на основе последовательностей, представленных в настоящем документе. Альтернативно можно использовать антитела, которые могут распознавать определенные дуплексы, включая дуплексы ДНК, дуплексы РНК и гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. Антитела в свою очередь можно метить, и можно проводить анализ, где дуплекс связан с поверхностью, так чтобы при образовании дуплекса на поверхности можно было выявить присутствие антитела, связанного с дуплексом.

Альтернативно экспрессию гена можно определять иммунологическими способами, такими как иммуногистохимическое окрашивание клеток или срезов тканей и анализ клеточной культуры или жидкостей организма, для количественного определения непосредственно экспрессии продукта гена. Антитела, подходящие для иммуногистохимического окрашивания и/или анализа образцов жидкостей, могут быть либо моноклональными или поликлональными, и их можно получать в любом млекопитающем. Удобно, чтобы антитела, подходящие для способа по настоящему изобретению, можно было получать против полипептида CD79b с нативной последовательностью, или против синтетического пептида на основе последовательностей ДНК, представленных в настоящем документе, или против экзогенной последовательности, слитой с ДНК CD79b и кодирующей специфичный для антитела эпитоп.

6. Очистка антитела против CD79b

Формы антитела против CD79b можно выделять из культуральной среды или из лизатов клеток-хозяев. В случае связанной с мембраной формы, его можно высвободить из мембраны с использованием подходящего раствора детергента (например, Triton-X 100) или посредством ферментативного расщепления. Клетки, используемые для экспрессии антитела против CD79b, можно разрушать различными физическими или химическими способами, такими как циклы замораживания и оттаивания, облучение ультразвуком, механическое разрушение или средства для лизиса клеток.

Может быть желательной очистка антитела против CD79b из рекомбинантных белков или полипептидов клеток. Следующие способы иллюстрируют подходящие способы очистки: фракционирование на ионообменной колонке; осаждение этанолом; обращенно-фазовая ВЭЖХ; хроматография на диоксиде кремния или на катионообменной смоле, такой как DEAE; хроматофокусирование; SDS-PAGE; осаждение сульфатом аммония; гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75; колонки с белком А-сефарозой для удаления примесей, таких как IgG; и

хелатирующие металлы колонки для связывания меченных эпитопом форм антитела против CD79b. Можно использовать различные способы очистки белков, и такие способы известны в данной области и описаны, например, Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). Выбранная стадия(и) очистки, будет зависеть, например, от характера используемого процесса получения и конкретного продуцируемого антитела против CD79b.

При использовании рекомбинантных способов, антитело может продуцироваться внутриклеточно, в периплазматическом пространстве, или непосредственно секретироваться в среду. Если такие антитела продуцируются внутриклеточно, на первой стадии, дебрис в виде частиц либо клеток-хозяев, либо лизированных фрагментов, удаляют, например, посредством центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) описан способ выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. В кратком изложении, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалять центрифугированием. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких экспрессирующих систем, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, элемента для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предшествующих стадий можно включать ингибитор протеаз, такой как PMSF, для ингибирования протеолиза, и для предотвращения роста ненужных контаминирующих организмов можно добавлять антибиотики.

Композицию антитела, полученную из клеток, можно очищать с использованием, например, хроматографии с гидроксилapatитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является предпочтительным способом очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, которые основаны на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех изоформ мыши и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). Матрицей, к которой присоединяют аффинный лиганд, наиболее часто является агароза, однако доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол позволяют более быстрые скорости потока и более короткое время обработки, чем скорости потока и время обработки, которых можно достигать посредством агарозы. Когда антитело содержит C_H3-домен, для очистки подходит смола Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Также доступны другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин-SEPHAROSETM, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (такая как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от подлежащего выделению антитела.

После предварительной стадии(ий) очистки, смесь, содержащую представляющее интерес антитело и примеси, можно подвергать хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким значением pH с использованием буфера для элюирования при

pH между приблизительно 2,5-4,5, предпочтительно проводимой при низких концентрациях соли (например, от приблизительно 0-0,25 М соли).

Г. Фармацевтические составы

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению можно вводить любым способом, подходящим для состояния, на которое направлено лечение. ADC, как правило, вводят парентерально, т.е. путем инфузии, подкожно, внутримышечно, внутривенно, интрадермально, интратекально и эпидурально.

Для лечения этих злокачественных опухолей, в одном варианте осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство вводят путем внутривенной инфузии.

Дозировка, вводимая путем инфузии, находится в диапазоне от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 10000 мкг/м² на дозу, как правило, по одной дозе в неделю всего с одной, двумя, тремя или четырьмя дозами. Альтернативно дозировка находится в диапазоне от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 1000 мкг/м², от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 800 мкг/м², от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 600 мкг/м², от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 400 мкг/м², от приблизительно 10 мкг/м² до приблизительно 500 мкг/м², от приблизительно 10 мкг/м² до приблизительно 300 мкг/м², от приблизительно 10 мкг/м² до приблизительно 200 мкг/м², и от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 200 мкг/м². Для смягчения или ослабления симптомов заболевания дозу можно вводить один раз в сутки, один раз в неделю, несколько раз в неделю, но реже чем один раз в сутки, несколько раз в месяц, но реже чем один раз в сутки, несколько раз в месяц, но реже чем один раз в неделю, один раз в месяц или периодически. Введение можно продолжать в течение любого из описанных интервалов до ремиссии опухоли или симптомов лимфомы, лейкоза, подвергаемых лечению. Введение можно продолжать после достижения ремиссии или смягчения симптомов, где такая ремиссия или смягчение продлеваются путем такого продолженного введения.

Изобретение также относится к способу смягчения аутоиммунного заболевания, включающему введение пациенту, страдающему аутоиммунным заболеванием, терапевтически эффективного количества конъюгата гуманизированное антитело 2F2-лекарственное средство по любому из предшествующих вариантов осуществления. В предпочтительных вариантах осуществления антитело вводят внутривенно или подкожно. Конъюгат антитело-лекарственное средство вводят внутривенно в дозировке в диапазоне от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 100 мг/м² на дозу и, в конкретном варианте осуществления, дозировка составляет от 1 мкг/м² до приблизительно 500 мкг/м². Для смягчения или ослабления симптомов заболевания дозу можно вводить один раз в сутки, один раз в неделю, несколько раз в неделю, но реже чем один раз в сутки, несколько раз в месяц, но реже чем один раз в сутки, несколько раз в месяц, но реже чем один раз в неделю, один раз в месяц или периодически. Введение можно продолжать в течение любого из описанных интервалов до смягчения или ослабления симптомов аутоиммунного заболевания, подвергаемого лечению. Введение можно продолжать после достижения смягчения или ослабления симптомов, где такое смягчение или ослабление продлеваются путем такого продолженного введения.

Изобретение также относится к способу лечения В-клеточного нарушения, включающему введение пациенту, страдающему В-клеточным нарушением, таким как

В-клеточно-пролиферативное нарушение (включая, но не ограничиваясь ими, лимфому и лейкоз) или аутоиммунное заболевание, терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела 2F2 по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем это антитело не является конъюгированным с цитотоксической молекулой или поддающейся детекции молекулой. Антитело, как правило, вводят в диапазоне дозировок от приблизительно 1 мкг/м² до приблизительно 1000 мг/м².

В одном аспекте изобретение, кроме того, относится к фармацевтическим составам, содержащим по меньшей мере одно антитело против CD79b по изобретению и/или по меньшей мере один его иммуноконъюгат и/или по меньшей мере один конъюгат антитела против CD79b-лекарственное средство по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтический состав содержит (1) антитело по изобретению и/или его иммуноконъюгат, и (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтический состав содержит (1) антитело по изобретению и/или его иммуноконъюгат, и необязательно, (2) по меньшей мере одно дополнительное лекарственное средство. Дополнительные лекарственные средства включают, но не ограничиваются ими, лекарственные средства, описанные ниже. ADC, как правило, можно вводить парентерально, т.е. путем инфузии, подкожно, внутримышечно, внутривенно, интрадермально, интратекально и эпидурально.

Терапевтические составы, содержащие антитело против CD79b или иммуноконъюгат против CD79b, используемый в соответствии с настоящим изобретением, получают для хранения путем смешивания антитела или иммуноконъюгата, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных составов или водных растворов.

Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как ацетат, Tris, фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензэтония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанола; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; изменяющие тоничность вещества, такие как трегалоза и хлорид натрия; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN[®], PLURONICS[®] или полиэтиленгликоль (PEG). Фармацевтические составы, подлежащие применению для введения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Этого легко достигать путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Составы, представленные в настоящем документе, также могут содержать более одного активного соединения, если необходимо для конкретного показания, на которое направлено лечение, предпочтительно соединения с дополняющими видами активностями, которые не оказывают неблагоприятного эффекта друг на друга. Например, в дополнение к антителу против CD79b, может быть желательным включение

в один состав дополнительного антитела, например, второго антитела против CD79b, которое связывается с отличающимся эпитопом на полипептиде CD79b, или антитела к какой-либо другой мишени, такой как фактор роста, который влияет на рост злокачественной опухоли. Альтернативно или дополнительно, композиция может далее
 5 содержать химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, цитокин, ингибирующее рост средство, антигормональное средство и/или кардиопротектор. Такие молекулы соответственно присутствуют в сочетании в количествах, которые эффективны для поставленной цели.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные,
 10 например, способами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы на основе гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы на основе полиметилметакрилата, соответственно, в коллоидные системы для доставки лекарственного средства (например, липосомы, микросферы на основе альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы), или в микроэмульсии. Такие способы
 15 описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, которые представлены в виде имеющих форму изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с
 20 замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США No. 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочная кислота-гликолевая кислота, такие как LUPRON DEPOT[®] (инъектируемые микросферы, состоящие
 25 из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата леупролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота обеспечивают высвобождение молекулы в течение свыше 100 суток, определенные гидрогели высвобождают белки
 30 в течение более коротких периодов времени. При инкапсулировании антитела остаются в организме в течение длительного времени, они могут подвергаться денатурации или образовывать агрегаты под воздействием влажности при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениями иммуногенности. В зависимости от вовлеченного механизма можно разрабатывать рациональные стратегии для стабилизации. Например, если открыто, что механизмом агрегации является
 35 межмолекулярное образование S-S связи через тио-дисульфидный обмен, стабилизации можно достигать модификацией сульфгидрильных остатков, лиофилизацией из кислых растворов, контролем содержания влаги, использованием соответствующих добавок и разработки специфичных полимерных композиций матриц.

Антитело может быть изготовлено в любой подходящей форме для доставки в ткань/
 40 клетку-мишень. Например, антитела можно изготавливать в виде иммунолипосом. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые подходят для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы
 45 обычно образуют двухслойную структуру, сходную с размещением липидов биологических мембран. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, такими как описано в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); патентах США No. 4485045 и 4544545; и WO97/38731, опубликованной 23 октября 1997 года. Липосомы

с усиленным временем циркуляции описаны в патенте США No. 5013556.

Особенно подходящие липосомы можно получать способом обращено-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и производного фосфатидилэтаноламина с PEG (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через
 5 фильтры с определенным размером пор с получением липосомы с требуемым диаметром. Fab'-фрагменты антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) посредством реакции дисульфидного обмена. В липосоме необязательно содержится химиотерапевтическое средство. См. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19): 1484
 10 (1989).

Фармацевтические составы, подлежащие применению для введения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Этого легко достигать путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Н. Лечение антителами против CD79b

Для определения экспрессии CD79b в злокачественной опухоли доступны различные анализы для детекции. В одном варианте осуществления, сверхэкспрессию полипептида CD79b можно анализировать посредством иммуногистохимии (ИНС). Погруженные в парафин срезы тканей из биоптатов опухолей можно подвергать ИНС-анализу и согласовывать с критериями интенсивности окрашивания белка CD79b следующим
 20 образом:

Показатель 0 - не наблюдается окрашивания или наблюдается окрашивание мембраны в менее чем 10% опухолевых клеток.

Показатель 1+ - выявляется слабое/едва заметное окрашивание мембраны в более чем 10% опухолевых клеток. Клетки окрашиваются только в части их мембраны.

Показатель 2+ - наблюдают от слабого до умеренного полное окрашивание мембраны в более чем 10% клеток опухоли.

Показатель 3+ - наблюдают от умеренного до сильного полное окрашивание мембраны в более чем 10% клеток опухоли.

Опухоли с показателями экспрессии полипептида CD79b, составляющими 0 или 1+,
 30 можно охарактеризовать как не сверхэкспрессирующие CD79b, а опухоли с показателями 2+ или 3+ можно охарактеризовать как сверхэкспрессирующие CD79b.

Альтернативно или дополнительно, для определения степени сверхэкспрессии (при ее наличии) CD79b в опухоли можно проводить анализы FISH, такие как INFORM® (продаваемый Ventana, Arizona) или PATHVISION® (Vysis, Illinois) на фиксированной
 35 формалином погруженной в парафин опухолевой ткани.

Сверхэкспрессию или амплификацию CD79b можно оценивать с использованием анализа для детекции *in vivo*, например, путем введения молекулы (такой как антитело), которая связывает молекулу, подлежащую детекции, и является меченной поддающейся детекции меткой (например, радиоактивным изотопом или флуоресцентной меткой) и
 40 внешнего сканирования пациента в отношении локализации метки.

Как описано выше, антитела против CD79b по изобретению обладают различными нетерапевтическими применениями. Антитела против CD79b по настоящему изобретению можно применять для определения стадии экспрессирующих полипептид CD79b злокачественных опухолей (например, при радиовизуализации). Антитела также
 45 пригодны для очистки или иммунопреципитации полипептида CD79b из клеток, для детекции и количественного определения полипептида CD79b *in vitro*, например, в ELISA или вестерн-блоте, для уничтожения и устранения экспрессирующих CD79b клеток из популяции смешанных клеток в качестве стадии при очистке других клеток.

В настоящее время, в зависимости от стадии злокачественной опухоли, лечение злокачественной опухоли вовлекает один или сочетание из следующих способов лечения: хирургическая операция для удаления ткани злокачественной опухоли, лучевая терапия и химиотерапия. Терапия антителом против CD79b может быть особенно желательной у пожилых пациентов, которые плохо переносят токсичность и побочные эффекты химиотерапии, и при метастазирующем заболевании, где лучевая терапия имеет ограниченную применимость. Нацеленные на опухоль антитела против CD79b по изобретению пригодны для ослабления экспрессирующих CD79b опухолей при первичной диагностике заболевания или в ходе обострения. Для терапевтических применений, антитело против CD79b можно использовать отдельно, или в комбинированной терапии, например, с гормонами, антиангиогенными средствами или радиоактивно мечеными соединениями, или с хирургической операцией, криотерапией и/или лучевой терапией. Лечение антителом против CD79b можно проводить вместе с другими формами общепринятой терапии, либо последовательно с общепринятой терапией, либо до, либо после общепринятой терапии. Для лечения злокачественной опухоли, в частности, у пациентов с хорошим риском, используют химиотерапевтические лекарственные средства, такие как TAXOTERE® (доцетаксел), TAXOL® (паклитаксел), эстрамустин и митоксантрон. В настоящем способе по изобретению для лечения или смягчения злокачественной опухоли, пациенту со злокачественной опухолью можно вводить антитело против CD79b вместе с введением одного или нескольких из указанных выше химиотерапевтических средств. В частности, предусматривается комбинированная терапия с паклитакселом и модифицированными производными (см., например, EP0600517). Антитело против CD79b можно вводить с терапевтически эффективной дозой химиотерапевтического средства. В другом варианте осуществления, антитело против CD79b вводят вместе с химиотерапией для усиления активности и эффективности химиотерапевтического средства, например, паклитаксела. В Physicians' Desk Reference (PDR) описаны дозировки этих средств, которые можно использовать для лечения различных злокачественных опухолей. Режим дозирования и дозировки этих указанных выше химиотерапевтических средств, которые являются терапевтически эффективными, зависят от конкретной злокачественной опухоли, подвергаемой лечению, степени заболевания и других факторов, известных квалифицированному терапевту, и они могут быть определены терапевтом.

В одном конкретном варианте осуществления, пациенту вводят конъюгат, содержащий антитело против CD79b, конъюгированное с цитотоксическим средством. Предпочтительно, иммуноконъюгат, связанный с белком CD79b, интернализуется клеткой, что приводит к повышенной терапевтической эффективности иммуноконъюгата в отношении уничтожения злокачественной клетки, с которой он связывается. В предпочтительном варианте осуществления, цитотоксическое средство нацелено на нуклеиновую кислоту в злокачественной клетке или повреждает ее. Примеры таких цитотоксических средств описаны выше и включают майтанзиноиды, калихеамицины, рибонуклеазы и ДНК-эндонуклеазы.

Антитела против CD79b или их конъюгаты с токсинами вводят пациенту-человеку, в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение, например, в качестве болюса или посредством непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, посредством внутримышечного, внутривентриального, интрацереброспинального, подкожного, внутрисуставного, внутрисиновиального, интратекального, перорального, местного или ингаляционного способов. Предпочтительным является внутривенное или подкожное введение антитела.

С введением антитела против CD79b можно комбинировать другие схемы лечения. Комбинированное введение включает совместное введение с использованием отдельных составов или одного фармацевтического состава, и последовательное введение в любом порядке, где предпочтительно существует период времени, когда оба (или все) активных

ингредиента одновременно оказывают их виды биологической активности.

Предпочтительно такая комбинированная терапия приводит к синергическому терапевтическому эффекту.

Также может быть желательным комбинированное введение антитела против или антител CD79b, с введением антитела, направленного против другого опухолевого антигена, ассоциированного с конкретной злокачественной опухолью.

В другом варианте осуществления, способы медикаментозного лечения по настоящему изобретению вовлекают комбинированное введение антитела против CD79b (или антител), и одного или нескольких химиотерапевтических средств или ингибирующих рост средств, включая совместное введение коктейлей различных химиотерапевтических средств, или другого цитотоксического средства(средств) или другого лекарственного средства(средств), которые также ингибируют рост опухоли. Химиотерапевтические средства включают эстрамустина фосфат, преднемустин, цисплатин, 5-фторурацил, мелфалан, циклофосфамид, гидроксимочевину и гидроксимочевинатаксаны (такие как паклитаксел и доксетаксел) и/или антрациклиновые антибиотики. Препараты и схемы дозирования для таких химиотерапевтических средств можно использовать в соответствии с инструкциями изготовителя или как определяет эмпирически квалифицированный специалист. Препараты и схемы дозирования для такой химиотерапии также описаны в Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). Антитело можно комбинировать с антигормональным соединением; например, с соединением антиэстрогена, таким как тамоксифен; с антипрогестероном, таким как онапристон (см., EP 616812); или с антиандрогеном, таким как флутамид, в дозировках, известных для таких молекул. Когда злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой андроген-зависимую опухоль, пациента можно предварительно подвергать антиандрогенной терапии и, после того, как опухоль становится андроген-независимой, пациенту можно вводить антитело против CD79b (и необязательно другие средства, как описано в настоящем документе).

Иногда, также полезным является совместное введение пациенту кардиопротектора (для предотвращения или снижения дисфункции миокарда, ассоциированной с терапией) или одного или нескольких цитокинов. В дополнение к указанным выше терапевтическим схемам, пациента можно подвергать хирургическому удалению злокачественных клеток и/или лучевой терапии (например, облучению наружными лучами или терапии радиоактивным средством, таким как антитело), до, одновременно или после терапии антителом. Подходящие дозировки для любого из указанных выше совместно вводимых средств являются такими, которые используются в настоящее время, и их можно снижать вследствие комбинированного действия (синергии) средства и антитела против CD79b.

Композицию антитела по изобретению можно изготавливать, дозировать и вводить способами, согласующимися с "Надлежащей медицинской практикой". Факторы, учитываемые в этом контексте, включают конкретное нарушение, подвергаемое лечению, конкретное млекопитающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, область доставки средства, способ введения, график введения, и другие факторы, известные врачам. Антитело не должно быть изготовлено, однако оно необязательно изготовлено, с одним или несколькими средствами, используемыми в настоящее время для профилактики и лечения

рассматриваемого нарушения. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антител по изобретению, присутствующего в составе, типа нарушения или лечения, и других факторов, рассмотренных выше. Их обычно используют в тех же дозировках и с теми же способами введения, которые описаны в настоящем документе

5 выше или в количестве приблизительно от 1 до 99% от описанных выше дозировок.

Для профилактики или лечения заболевания, дозировку и способ введения может выбирать врач в соответствии с известными критериями. Соответствующая дозировка антитела может зависеть от типа заболевания, на которое направлено лечение, как

10 определено выше, тяжести и течения заболевания, от профилактических или терапевтических целей введения молекулы, предшествующего лечения, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело и от решения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту за один раз или на протяжении серии введений. Предпочтительно, антитело вводят путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции. В зависимости от типа и тяжести заболевания, исходная предполагаемая

15 дозировка для введения пациенту составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 50 мг/кг массы тела (например, приблизительно 0,1-15 мг/кг/доза) антитела, например, либо посредством одного или нескольких отдельных введений, либо посредством непрерывной инфузии. Схема дозирования может включать введение исходной нагрузочной дозы, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующей

20 поддерживающей дозой антитела против CD79b приблизительно 2 мг/кг каждую неделю. Однако могут быть подходящими другие схемы дозирования. Типичная суточная дозировка может варьировать приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В случае многократных введений в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, введение повторяют до

25 возникновения требуемого подавления симптомов заболевания. Мониторинг хода этой терапии легко проводить посредством общепринятых способов и анализов, и на основании критериев, известных врачу и другим квалифицированным специалистам.

Помимо введения белка антитела пациенту, в настоящей заявке предусматривается введение антитела посредством генной терапии. Такое введение нуклеиновой кислоты,

30 кодирующей антитело, охватывается выражением "введение терапевтически эффективного количества антитела". См., например, WO96/07321, опубликованную 14 марта 1996 года, в отношении применения генной терапии для создания внутриклеточных антител.

Существует два основных подхода для введения нуклеиновой кислоты (необязательно,

35 содержащейся в векторе) в клетки пациента; *in vivo* и *ex vivo*. Для доставки *in vivo*, нуклеиновую кислоту инъецируют непосредственно индивиду, и, обычно область, где требуется антитело. Для обработки *ex vivo*, клетки индивида извлекают, в эти клетки вводят нуклеиновую кислоту, и модифицированные клетки возвращают индивиду либо непосредственно, либо, например, в инкапсулированной форме в пористых мембранах,

40 которые имплантируют пациенту (см., например, патенты США No. 4892538 и 5283187). Существует множество способов введения нуклеиновых кислот в жизнеспособные клетки. Способы варьируют в зависимости от того, переносят ли нуклеиновую кислоту в культивируемые клетки *in vitro*, или их переносят *in vivo* в клетки предполагаемого хозяина. Способы, подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки

45 млекопитающих *in vitro*, включают применение липосом, электропорацию, микроинъекцию, слияние клеток, способ с DEAE-декстраном и осаждение фосфатом кальция. Широко используемым вектором для доставки гена *ex vivo* является ретровирус.

Предпочтительные в настоящее время способы переноса нуклеиновых кислот *in vivo*

включают трансфекцию вирусными векторами (такими как аденовирус, вирус простого герпеса I, или аденоассоциированный вирус) и системы на основе липидов (подходящие липиды для опосредуемого липидами переноса гена представляют собой, например, DOTMA, DOPE и DC-Chol). Для обзора известных в настоящее время протоколов маркирования генов и генной терапии см. Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Также см. WO 93/25673 и ссылки, цитированные в ней.

Антитела против CD79b по изобретению могут быть представлены в различных формах, охватываемых определением "антитела" в настоящем документе. Таким образом, антитела включают полноразмерное или интактное антитело, фрагменты антитела, антитело с нативной последовательностью или с вариантами аминокислот, гуманизированные, химерные или слитые антитела, иммуноконъюгаты и их функциональные фрагменты. В слитых антителах, последовательность антитела является слитой с гетерологичной полипептидной последовательностью. Антитела может быть модифицированным в Fc-области для обеспечения требуемых эффекторных функций. Как рассмотрено более подробно в разделах настоящего документе "голое" антитело с соответствующими Fc-областями, связанное на клеточной поверхности может индуцировать цитотоксичность, например, посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или путем привлечения комплемента при комплемент-зависимой цитотоксичности, или каким-либо другим механизмом. Альтернативно когда является желательным устранение или снижение эффекторной функции, чтобы минимизировать побочные эффекты или терапевтические осложнения, можно использовать некоторые другие Fc-области.

В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание, или связывается по существу, с тем же эпитопом, что и антитела по изобретению. Также предусматриваются антитела, имеющие биологические характеристики представленных антител против CD79b по изобретению, конкретно включая нацеливание на опухоль *in vivo* и какое-либо ингибирование пролиферации клеток или цитотоксические характеристики.

Способы получения указанных выше антител более подробно рассмотрены в настоящем документе.

Настоящие антитела против CD79b пригодны для нацеливания на экспрессирующую CD79b опухоль или смягчения одного или нескольких симптомов злокачественной опухоли у млекопитающего. Такая злокачественная опухоль включает, но не ограничивается ими, гемопоэтические злокачественные опухоли или связанные с кровью злокачественные опухоли, такие как лимфома, лейкоз, миелома или лимфоидные злокачественные опухоли, а также злокачественные опухоли селезенки и злокачественные опухоли лимфатических узлов. Более конкретные примеры таких ассоциированных с В-клетками злокачественных опухолей включают, например, высокодифференцированные, промежуточные или низкодифференцированные лимфомы (включая В-клеточные лимфомы, например, такие как В-клеточная лимфома, ассоциированная с лимфоидной тканью слизистых оболочек, и неходжкинская лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны, лимфома Беркитта, мелколимфоцитарная лимфома, лимфома клеток маргинальной зоны, диффузная крупноклеточная лимфома, фолликулярная лимфома, и лимфома Ходжкина и Т-клеточные лимфомы) и лейкозы (включая вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, такой как В-клеточный лейкоз (CD5+ В-лимфоциты), миелоидный лейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоидный лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз и миелодисплазия), и другие гематологические и/или

ассоциированные с В-клетками или Т-клетками злокачественные опухоли.

Злокачественные опухоли охватывают метастазирующие злокачественные опухоли любого из указанных выше типов. Антитело способно связываться по меньшей мере с частью злокачественных клеток, которые экспрессируют полипептид CD79b у

5 млекопитающего. В предпочтительном варианте осуществления, антитело является эффективным для разрушения или уничтожения экспрессирующих CD79b опухолевых клеток или ингибирования роста таких опухолевых клеток, *in vitro* или *in vivo*, при связывании с полипептидом CD79b на клетке. Такое антитело включает “голое” антитело против CD79b (не конъюгированное с каким-либо средством). Простые антитела,

10 которые обладают цитотоксическими или ингибирующими клеточный рост свойствами можно далее объединять с цитотоксическим средством для того, чтобы они были более эффективными в отношении разрушения опухоли. Цитотоксические свойства можно придавать антителу против CD79b, например, посредством конъюгации антитела с цитотоксическим средством, с образованием иммуноконъюгата, как описано в

15 настоящем документе. Цитотоксическое средство или ингибирующее рост средство предпочтительно представляет собой низкомолекулярное соединение. Предпочтительными являются токсины, такие как калихеамицин или майтанзиноид и его аналоги или производные.

Изобретение относится к композиции, содержащей антитело против CD79b по

20 изобретению и носитель. Для целей лечения злокачественной опухоли, композиции можно вводить пациенту, нуждающемуся в таком лечении, где композиция может содержать одно или несколько антител против CD79b, присутствующих в качестве иммуноконъюгата или “голового” антитела. В следующем варианте осуществления, композиции могут содержать эти антитела в сочетании с другими лекарственными

25 средствами, такими как цитотоксические или ингибирующие рост средства, включая химиотерапевтические средства. Также изобретение относится к составам, содержащим антитело против CD79b по изобретению и носитель. В одном варианте осуществления, состав представляет собой терапевтический состав, содержащий фармацевтически приемлемый носитель.

30 Другой аспект изобретения относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела против CD79b. Предусматриваются нуклеиновые кислоты, кодирующие как Н-, так и L-цепи, и особенно остатки гипервариабельной области, цепи, которые кодируют антитело с нативной последовательностью, а также варианты, модификации и гуманизированные версии антитела.

35 Также изобретение относится к способам, подходящим для лечения экспрессирующей полипептид CD79b злокачественной опухоли или смягчения одного или нескольких симптомов злокачественной опухоли у млекопитающего, включающим введение млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела против CD79b. Терапевтические композиции антитела можно вводить кратковременно (неотложно)

40 или длительно, или прерывающимся образом, в соответствии с решением врача. Также предусматриваются способы ингибирования роста и уничтожения экспрессирующей полипептид CD79b клетки.

Также изобретение относится к наборам и изделиям, содержащим по меньшей мере одно антитело против CD79b. Наборы, содержащие антитела против CD79b, применимы,

45 например, для анализов уничтожения клеток CD79b, для очистки или иммунопреципитации полипептида CD79b из клеток. Например, для выделения и очистки CD79b, набор может содержать антитело против CD79b, связанное с гранулами (например, с гранулами из сефарозы). Могут быть предоставлены наборы, которые

содержат антитела для детекции и количественного определения CD79b *in vitro*, например, в ELISA или вестерн-блоте. Такое антитело, подходящее для детекции, может быть предоставлено с меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка.

I. Лечение конъюгатом антитело-лекарственное средство

5 Предусматривается, что конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению можно использовать для лечения различных заболеваний или нарушений, например, характеризующихся сверхэкспрессией опухолевого антигена. Иллюстративные состояния или гиперпролиферативные нарушения включают доброкачественные или злокачественные опухоли; лейкоз и лимфоидные
10 злокачественные опухоли. Другие состояния включают нейрональные, глиальные, астроглиальные, гипоталамические, железистые, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, бластоцелльные, воспалительные, ангиогенные и иммунологические, в том числе аутоиммунные, нарушения.

Соединения ADC, которые идентифицированы в моделях на животных в клеточных
15 анализах, можно далее тестировать у обладающих опухолью высших приматов и в клинических испытаниях у человека. Клинические испытания у человека могут быть предназначены для тестирования эффективности моноклонального антитела против CD79b или иммуноконъюгата по изобретению у пациентов, страдающих В-клеточно-пролиферативным нарушением, включая, но не ограничиваясь ими, лимфому,
20 неходжкинскую лимфому (NHL), агрессивную NHL, рецидивирующую агрессивную NHL, рецидивирующую вялотекущую NHL, рефрактерную NHL, рефрактерную вялотекущую NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарную лимфому, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфому из клеток мантийной зоны. Клиническое испытание может быть
25 предназначено для оценки эффективности ADC в сочетаниях с известными схемами лечения, такими как лучевая терапия и/или химиотерапия, вовлекающими химиотерапевтические и/или цитотоксические средства.

Как правило, заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представляет собой гиперпролиферативное заболевание, такое как В-клеточно-пролиферативное нарушение
30 и/или В-клеточная злокачественная опухоль. Примеры злокачественной опухоли, подлежащей лечению согласно настоящему документу, включают, но не ограничиваются ими, В-клеточно-пролиферативное нарушение, выбранное из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического
35 лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

Злокачественная опухоль может содержать экспрессирующие CD79b клетки, так что ADC по настоящему изобретению способны связываться со злокачественными клетками.
40 Для определения экспрессии CD79b в злокачественной опухоли доступны различные диагностические/прогностические способы анализа. В одном варианте осуществления, сверхэкспрессию CD79b можно анализировать посредством ИНС. Погруженные в парафин срезы ткани из биоптата опухоли можно подвергать анализу ИНС и согласовывать с критериями интенсивности окрашивания белка CD79b, связанными
45 со степенью окрашивания и с долей исследуемых опухолевых клеток.

Для профилактики или лечения заболевания, соответствующая дозировка ADC зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от профилактических или терапевтических целей введения

молекулы, предшествующего лечения, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело и от решения лечащего врача. Молекулу подходящим образом вводят пациенту за один раз или на протяжении серии введений. В зависимости от типа и тяжести заболевания, исходная предполагаемая дозировка для введения пациенту составляет
 5 приблизительно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг массы тела (например, 0,1-20 мг/кг) молекулы, например, либо посредством одного или нескольких отдельных введений, либо посредством непрерывной инфузии. Типичная суточная дозировка может варьировать приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Иллюстративная дозировка ADC, подлежащая введению пациенту,
 10 находится в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела пациента.

В случае многократных введений в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, введение повторяют до возникновения требуемого подавления симптомов заболевания. Иллюстративная схема дозирования включает введение исходной
 15 нагрузочной дозы, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующей еженедельной поддерживающей дозой, составляющей приблизительно 2 мг/кг антитела против ErbB2. Могут быть пригодны другие схемы дозирования. Мониторинг хода этой терапии легко проводить посредством общепринятых способов и анализов.

J. Комбинированная терапия

20 Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению можно комбинировать, в фармацевтическом комбинированном составе или схеме дозирования в качестве комбинированной терапии, со вторым соединением, имеющим свойства, направленные против злокачественной опухоли. Второе соединение фармацевтического комбинированного состава или схемы дозирования предпочтительно обладает видами
 25 активности, дополняющими виды активности ADC в сочетании, так что они не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга.

Второе соединение может представлять собой химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, цитокин, ингибирующее рост средство, антигормональное средство и/или кардиопротектор. Такие молекулы подходящим образом присутствуют
 30 в сочетании в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели.

Фармацевтическая композиция, содержащая ADC по изобретению, также может иметь терапевтически эффективное количество химиотерапевтического средства, такого как ингибитор образования тубулина, ингибитор топоизомеразы или связывающее ДНК средство.

35 В одном аспекте первое соединение представляет собой ADC против CD79b по изобретению, а второе соединение представляет собой антитело против CD20 (либо "голое" антитело, либо ADC). В одном варианте осуществления второе соединение представляет собой антитело против CD20 ритуксимаб (Rituxan®) или 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Другие антитела, подходящие для комбинированной
 40 иммунотерапии посредством ADC против CD79b по изобретению, включают, но не ограничиваются, антитело против VEGF (например, Avastin®).

Другие схемы лечения можно комбинировать с проведением лечения против злокачественной опухоли, идентифицированной в соответствии с этим изобретением, включая, но не ограничиваясь ими, лучевую терапию и/или трансплантацию костного
 45 мозга и периферической крови, и/или цитотоксическое средство, химиотерапевтическое средство, или ингибирующее рост средство. В одном из таких вариантов осуществления, химиотерапевтическое средство представляет собой средство или сочетание средств, например, таких как циклофосфамид, гидроксиданорубицин, адриамицин,

доксорубицин, винкристин (OncovinTM), преднизолон, CHOP, CVP или COP, или иммунотерапевтические средства, такие как антитело против CD20 (например, Rituxan®) или антитело против VEGF (например, Avastin®).

Комбинированную терапию можно проводить в качестве одновременной или последовательной схемы. При последовательном введении, сочетание можно вводить за два или более введений. Комбинированное введение включает совместное введение с использованием отдельных составов или одного фармацевтического состава, и последовательное введение в любом порядке, где предпочтительно существует период времени, когда оба (или все) активных ингредиента одновременно оказывают их виды биологической активности.

В одном варианте осуществления, лечение посредством ADC вовлекает комбинированное введение средства против злокачественной опухоли, идентифицированного в настоящем документе, и одного или нескольких химиотерапевтических средств или ингибирующих рост средств, включая совместное введение коктейлей различных химиотерапевтических средств. Химиотерапевтические средства включают таксаны (такие как паклитаксел и доцетаксел) и/или антрациклиновые антибиотики. Препараты и схемы дозирования таких химиотерапевтических средств можно использовать в соответствии с инструкциями изготовителя, или как может эмпирически определить квалифицированный специалист. Препараты и схемы дозирования для такой химиотерапии также описаны в "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Подходящие дозировки для любых из представленных выше совместно вводимых средств представляют собой дозировки, используемые в настоящее время, и их можно снижать благодаря комбинированному действию (синергии) вновь идентифицированного средства и других химиотерапевтических средств или способов лечения.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и быть "синергичной", т.е. эффект, достигаемый при совместном применении активных ингредиентов, превышает сумму эффектов вследствие применения соединений по отдельности. Синергического эффекта можно достигать, когда активные ингредиенты: (1) совместно изготавливают и вводят или доставляют одновременно в комбинированном единичном дозированном составе; (2) доставляют поочередно или параллельно в виде отдельных составов; или (3) применяют с помощью какой-либо другой схемы. При доставке путем поочередной терапии, синергический эффект может быть достигнут, когда соединения вводят или доставляют последовательно, например, посредством различных инъекций в отдельных шприцах. Как правило, в ходе поочередной терапии, эффективную дозировку каждого активного ингредиента вводят последовательно, т.е. серийно, а при комбинированной терапии эффективные дозировки двух или более активных ингредиентов вводят вместе.

К. Изделия и наборы

Другой вариант осуществления этого изобретения относится к изделию, содержащему материалы, подходящие для лечения, профилактики и/или диагностики экспрессирующей CD79b злокачественной опухоли. Изделие содержит контейнер и этикетку на контейнере или вкладыш в упаковку, прилагаемый к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из множества материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения, профилактики или диагностики злокачественного состояния, и может иметь стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора

или флакон, имеющий пробку, проницаемую для иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно активное вещество в композиции представляет собой антитело против CD79b по изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения злокачественной опухоли. Кроме того, на этикетке или вкладыше в упаковку содержится информация по введению композиции антитела пациенту со злокачественной опухолью. Более того, изделие далее может содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, он может включать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы.

Также предусматриваются наборы, которые подходят для различных целей, например, для анализов уничтожения экспрессирующих CD79b клеток, для очистки или иммунопреципитации полипептида CD79b из клеток. Для выделения и очистки полипептида CD79b, набор может содержать антитело против CD79b, связанное с гранулами (например, с гранулами из сефарозы). Могут быть предоставлены наборы, которые содержат антитела для детекции и количественного определения полипептида CD79b *in vitro*, например, в ELISA или вестерн-блоте. Как и в случае изделия, набор содержит контейнер и этикетку на контейнере или вкладыш в упаковку, прилагаемый к контейнеру. В контейнере содержится композиция, содержащая по меньшей мере одно антитело против CD79b по изобретению. Могут быть включены дополнительные контейнеры, которые содержат, например, разбавители и буферы, контрольные антитела. На этикетке или вкладыше в упаковку может быть предоставлено описание композиции, а также инструкции по предполагаемому применению *in vitro* или для детекции.

L. Применение полипептидов CD79b

Это изобретение относится к способам скрининга соединений для идентификации соединений, которые имитируют полипептид CD79b (агонисты) или препятствуют эффекту полипептида CD79b (антагонисты). Разработаны скрининговые анализы для предполагаемых лекарственных средств-антагонистов в целях идентификации соединений, которые связываются или образуют комплекс с полипептидами CD79b, кодируемыми генами, идентифицированными в настоящем документе, или иным образом препятствуют взаимодействию кодируемых полипептидов с другими клеточными белками, включая например, ингибирование экспрессии полипептида CD79b из клеток. Такие скрининговые анализы включают анализы, подходящие для высокопроизводительного скрининга химических библиотек, что делает их особенно подходящими для идентификации низкомолекулярных лекарственных средств-кандидатов.

Анализы можно проводить в различных форматах, включая анализы белок-белкового связывания, биохимические скрининговые анализы, иммунологические анализы и клеточные анализы, которые хорошо охарактеризованы в данной области.

Все анализы антагонистов являются общими тем, что в них требуется контактирование лекарственного средства-кандидата с полипептидом CD79b, кодируемым нуклеиновой кислотой, идентифицированной в настоящем документе, в условиях и в течение периода времени, достаточных для обеспечения взаимодействия этих двух компонентов.

В анализах связывания взаимодействие представляет собой связывание, и образованный комплекс можно выделять или подвергать детекции в реакционной смеси.

В конкретном варианте осуществления, полипептид CD79b, кодируемый геном, идентифицированным в настоящем документе, или лекарственное средство-кандидат, иммобилизуют на твердой фазе, например, на микропланшете для титрования, путем ковалентного или нековалентного присоединения. Нековалентное присоединение, как правило, проводят нанесением на твердую фазу раствора полипептида CD79b и высушиванием. Альтернативно иммобилизованное антитело, например, моноклональное антитело, специфичное к полипептиду CD79b, подлежащему иммобилизации, можно использовать для заякоривания его на твердой поверхности. Анализ проводят путем добавления неиммобилизованного компонента, который может быть меченным поддающейся детекции меткой, к иммобилизованному компоненту, например, покрытой поверхности, содержащей заякоренный компонент. Когда реакция завершается, не вступившие в реакцию компоненты удаляют, например, путем промывания, и проводят детекцию комплексов, заякоренных на твердой поверхности. Когда исходно неиммобилизованный компонент обладает поддающейся детекции меткой, детекция метки, иммобилизованной на поверхности, указывает на то, что произошло образование комплекса. Когда исходно неиммобилизованный компонент не обладает меткой, детекцию образования комплекса можно проводить, например, с использованием меченого антитела, специфично связывающего иммобилизованный комплекс.

Если соединение-кандидат взаимодействует с конкретным полипептидом CD79b, кодируемым геном, идентифицированным в настоящем документе, но не связывается с ним, его взаимодействие с этим полипептидом можно анализировать хорошо известными способами детекции белок-белковых взаимодействий. Такие анализы включают традиционные подходы, например, такие как перекрестное связывание, коиммунопреципитация и совместная очистка через градиенты или хроматографические колонки. Кроме того, мониторинг белок-белковых взаимодействий можно проводить с использованием дрожжевой генетической системы, описанной Fields и коллегами (Fields and Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) как описано Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Многие активаторы транскрипции, такие как GAL4 дрожжей, состоят из двух физически разделенных модульных доменов, причем один из них действует как ДНК-связывающий домен, а другой функционирует как домен активации транскрипции. Дрожжевая экспрессирующая система, описанная в указанных выше публикациях (обычно называемая "двухгибридной системой") использует это свойство, и в ней используются два гибридных белка, в одном из которых белок-мишень является слитым с ДНК-связывающим доменом GAL4, а в другом из которых активирующие белки-кандидаты являются слитыми с доменом активации. Экспрессия репортерного гена GAL1-lacZ под контролем GAL4-активированного промотора зависит от восстановления активности GAL4 посредством белок-белкового взаимодействия. Колонии, содержащие взаимодействующие полипептиды выявляют с помощью хромогенного субстрата для β -галактозидазы. Полный набор (MATCHMAKERTM) для идентификации белок-белковых взаимодействий между двумя конкретными белками с использованием двухгибридного способа является коммерчески доступным от Clontech. Эта система также может быть расширена для картирования доменов белков, вовлеченных в определенные взаимодействия белков, а также для определения положения аминокислотных остатков, которые являются важными для этих взаимодействий.

Соединения, которые препятствуют взаимодействию гена, кодирующего полипептид CD79b, идентифицированный в настоящем документе, и других внутри- или внеклеточных компонентов, можно тестировать следующим образом: обычно получают

реакционную смесь, содержащую продукт гена и внутри- или внеклеточный компонент в условиях и в течение периода времени, позволяющих взаимодействие и связывание двух продуктов. Для тестирования способности соединения-кандидата ингибировать связывание, проводят реакцию в отсутствие и в присутствии тестируемого соединения.

- 5 Кроме того, в третью реакционную смесь можно добавлять плацебо, чтобы она служила в качестве положительного контроля. Мониторинг связывания (образования комплекса) между тестируемым соединением и внутри- или внеклеточным компонентом, присутствующим в смеси, проводят, как описано в настоящем документе выше. Образование комплекса в контрольной реакции(ях) но не в реакционной смеси, содержащей тестируемое соединение, указывает на то, что тестируемое соединение препятствует взаимодействию тестируемого соединения и его партнера по реакции.

- 10 Для анализа антагонистов, полипептид CD79b можно добавлять к клетке вместе с соединением, подлежащим скринингу на конкретную активность, и способность соединения ингибировать представляющую интерес активность в присутствии полипептида CD79b указывает на то, что соединение представляет собой антагонист полипептида CD79b. Альтернативно, детекцию антагонистов можно проводить путем комбинирования полипептида CD79b и потенциального антагониста с мембраносвязанными рецепторами полипептида CD79b или рекомбинантными рецепторами в соответствующих условиях для конкурентного анализа связывания.
- 20 Полипептид CD79b можно метить, например радиоактивной меткой, так что количество молекул полипептида CD79b, связавшихся с рецептором, можно использовать для определения эффективности потенциального антагониста. Ген, кодирующий рецептор, можно идентифицировать множеством способов, известных специалистам в данной области, например, пэннингом лиганда и сортировкой FACS. Coligan et al., Current
- 25 Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Предпочтительно используют экспрессирующее клонирование, где получают полиаденилированную РНК из клетки, ответственной за полипептид CD79b и библиотеку кДНК, созданную из этой РНК, подразделяют на пулы и используют для трансфекции клеток COS или других клеток, которые не отвечают на полипептид CD79b. Трансфицированные клетки, которые выращивают на предметных
- 30 стеклах, подвергают воздействию меченного полипептида CD79b. Полипептид CD79b можно метить различными способами, включая йодирование или включение участка распознавания для конкретной сайт-специфической протеинкиназы. После фиксации и инкубации, стекла подвергают радиоавтографическому анализу. Идентифицируют положительные пулы и получают субпулы и повторно трансфицируют их с
- 35 использованием согласованного процесса получения субпулов и повторного скрининга, что в конечном итоге приводит к одному клону, который кодирует предполагаемый рецептор.

- В качестве альтернативного подхода для идентификации рецептора, меченый полипептид CD79b можно подвергать фотоаффинному связыванию с клеточной
- 40 мембраной или препаратами экстрактов, которые экспрессируют молекулу рецептора. Поперечно сшитый материал разделяют посредством PAGE и проявляют на рентгеновской пленке. Меченый комплекс, содержащий рецептор можно вырезать, разделять на пептидные фрагменты, и подвергать белковому микросеквенированию. Аминокислотную последовательность, полученную путем микросеквенирования,
- 45 можно использовать для конструирования набора вырожденных олигонуклеотидных зондов для скрининга библиотеки кДНК в целях идентификации гена, кодирующего предполагаемый рецептор.

В другом анализе антагонистов, клетки млекопитающих или мембранный препарат,

экспрессирующий рецептор, можно инкубировать с меченым полипептидом CD79b в присутствии соединения-кандидата. Затем можно измерять способность соединения усиливать или блокировать это взаимодействие.

Более конкретные примеры потенциальных антагонистов включают олигонуклеотид, который связывается с иммуноглобулином, слитым с полипептидом CD79b, и, в частности, антителами, включая, но не ограничиваясь ими, поли- и моноклональные антитела и фрагменты антител, одноцепочечные антитела, антиидиотипические антитела, и химерные или гуманизированные версии таких антител или фрагментов, а также антитела человека и фрагменты антител. Альтернативно, потенциальный антагонист может быть высоко родственным белком, например, мутантной формой полипептида CD79b, который распознает рецептор, но не оказывает эффекта, тем самым, конкурентно ингибируя действие полипептида CD79b.

Антитела, специфично связывающие полипептид CD79b, идентифицированный в настоящем документе, а также другие молекулы, идентифицированные скрининговыми анализами, описанными в настоящем документе выше, можно вводить для лечения различных нарушений, включая злокачественную опухоль, в форме фармацевтических композиций.

Если полипептид CD79b является внутриклеточным и в качестве ингибиторов используют целые антитела, предпочтительными являются интернализирующиеся антитела. Однако также для доставки антитела или фрагмента антитела в клетки можно использовать липофекцию или липосомы. Когда используют фрагменты антител, предпочтительным является наименьший ингибиторный фрагмент, который специфично связывается со связывающим доменом белка-мишени. Например, на основе последовательностей варибельной области антитела, можно конструировать молекулы пептидов, которые сохраняют способность связывать белковую последовательность-мишень. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или продуцировать технологией рекомбинантных ДНК. См., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

Состав, описанный в настоящем документе, также может содержать более одного активного соединения, если необходимо, для конкретного показания, на которое направлено лечение, предпочтительно, соединения с видами дополняющими активность, которые не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Альтернативно или дополнительно, композиция может содержать средство, которое усиливает ее функцию, например, такое как цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или ингибирующее рост средство. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в сочетании в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели.

М. Производные антител

Антитела по настоящему изобретению можно далее модифицировать, чтобы они содержали дополнительные небелковые группы, которые известны в данной области и легко доступны. Предпочтительно, группы, подходящие для получения производного антитела, представляют собой растворимые в воде полимеры. Неограничивающие примеры растворимых в воде полимеров включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо случайные сополимеры), и декстран или поли(н-винил пирролидон)полиэтиленгликоль, пропропиленгликоль гомополимеры, сополимеры окись полипропилена/окись этилена, полиоксиэтилированные полиолы

(например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества при изготовлении вследствие его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу, и он может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, связанных с антителом, может варьировать, и если связано более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для получения производного, можно определять, исходя из соображений, включающих, но не ограничивающихся ими, конкретные свойства или функции антитела, подлежащего усовершенствованию, применения производного антитела в терапии в определенных условиях и т.д.

N. Способ скрининга

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу определения присутствия полипептида CD79b в образце, предположительно содержащем полипептид CD79b, где способ включает воздействие на образце конъюгата антитело-лекарственное средство, который связывается с полипептидом CD79b, и определение связывания конъюгата антитело-лекарственное средство с полипептидом CD79b в образце, где присутствие такого связывания указывает на наличие полипептида CD79b в образце. Необязательно, образец может содержать клетки (которые могут представлять собой злокачественные клетки) предположительно экспрессирующие полипептид CD79b. Конъюгат антитело-лекарственное средство, используемый в способе, необязательно можно метить поддающейся детекции меткой, связывать с твердой подложкой или сходные с ними.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу диагностики наличия опухоли у млекопитающего, где способ включает (а) контактирование тестируемого образца, содержащего клетки ткани, полученные из млекопитающего, с конъюгатом антитело-лекарственное средство, который связывается с полипептидом CD79b, и (b) детекцию образования комплекса между конъюгатом антитело-лекарственное средство и полипептидом CD79b в тестируемом образце, где образование комплекса указывает на наличие опухоли у млекопитающего. Необязательно, конъюгат антитело-лекарственное средство, является меченным поддающейся детекции меткой, связанным с твердой подложкой или сходные с ними, и/или тестируемый образец клеток ткани получают от индивида, предположительно имеющего злокачественную опухоль.

IV. Дополнительные способы применения антител против CD79b и иммуноконъюгатов

A. Диагностические способы и способы детекции

В одном аспекте антитела против CD79b и иммуноконъюгаты по изобретению подходят для детекции наличия CD79b в биологическом образце. Термин "детекция", как используют в настоящем документе, включает количественную или качественную детекцию. В определенных вариантах осуществления, биологический образец включает клетку или ткань. В определенных вариантах осуществления, такие ткани включают нормальные и/или злокачественные ткани, которые экспрессируют CD79b на более высоких уровнях относительно других тканей, например, В-клеток и/или ассоциированных с В-клетками тканей.

В одном аспекте изобретение относится к способу детекции наличия CD79b в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления способ включает контактирование биологического образца с антителом против CD79b в условиях, позволяющих связывание антитела против CD79b с CD79b, и детекцию образования комплекса между антителом против CD79b и CD79b.

В одном аспекте изобретение относится к способу диагностики нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией CD79b. В определенных вариантах осуществления способ включает контактирование тестируемой клетки с антителом против CD79b; определение уровня экспрессии (либо количественно, либо качественно) CD79b тестируемой клеткой путем детекции связывания антитела против CD79b с CD79b; и сравнение уровня экспрессии CD79b тестируемой клеткой с уровнем экспрессии CD79b контрольной клеткой (например, нормальной клеткой, происходящей из той же ткани, что и тестируемая клетка, или клеткой, которая экспрессирует CD79b на уровнях, сравнимых с уровнями для нормальной клетки), где более высокий уровень экспрессии CD79b тестируемой клеткой по сравнению с контрольной клеткой указывает на наличие нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией CD79b. В определенных вариантах осуществления, тестируемую клетку получают от индивида, предположительно имеющего нарушение, ассоциированное с повышенной экспрессией CD79b. В определенных вариантах осуществления, нарушение представляет собой клеточно-пролиферативное нарушение, такое как злокачественная опухоль или опухоль.

Иллюстративные клеточно-пролиферативные нарушения, которые можно диагностировать с использованием антитела по изобретению, включают В-клеточное нарушение и/или В-клеточно-пролиферативное нарушение, включая, но не ограничиваясь ими, лимфому, неходжкинскую лимфому (NHL), агрессивную NHL, рецидивирующую агрессивную NHL, рецидивирующую вялотекущую NHL, рефрактерную NHL, рефрактерную вялотекущую NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарную лимфому, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфому из клеток мантийной зоны.

В определенных вариантах осуществления, способ диагностики или детекции, такой как способы, описанные выше, включает детекцию связывания антитела против CD79b с CD79b, экспрессированным на поверхности клетки или в мембранном препарате, полученном из клетки, экспрессирующей CD79b на своей поверхности. В определенных вариантах осуществления, способ включает контактирование клетки с антителом против CD79b в условиях, позволяющих связывание антитела против CD79b с CD79b, и детекцию образования комплекса между антителом против CD79b и CD79b на поверхности клетки. Иллюстративный анализ для детекции связывания антитела против CD79b с CD79b, экспрессированным на поверхности клетки, представляет собой анализ "FACS".

Для детекции связывания антител против CD79b с CD79b можно использовать некоторые другие способы. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, анализы связывания антигена, которые хорошо известны в данной области, такие как вестерн-блоты, радиоиммунные анализы, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммунные "сэндвич"-анализы, анализы иммунопреципитации, флуоресцентные иммунологические анализы, иммунологические анализы с белком А и иммуногистохимию (ИНС).

В определенных вариантах осуществления, антитела против CD79b являются мечеными. Метки включают, но не ограничиваются ими, метки или группы, которые подвергают детекции прямо (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также такие группы, как ферменты или лиганды, которые подвергают детекции непрямо, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия.

Иллюстративные метки включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы,

например, люциферазу светляка и бактериальную люциферазу (патент США No. 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазы сахаридов, например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу,

5 гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, связанные с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

В определенных вариантах осуществления, антитела против CD79b иммобилизуют на нерастворимом матриксе. Иммобилизация включает отделение антитела против CD79b от любого CD79b, который остается свободным в растворе. Ее осуществляют, либо обеспечивая нерастворимость антитела против CD79b перед анализом, например, путем адсорбции на нерастворимой в воде матрице или поверхности (Bennich et al., U.S. 3720760), или путем ковалентного присоединения (например, с использованием поперечного сшивания глутаральдегидом), либо обеспечивая нерастворимость антитела против CD79b после образования комплекса между антителом против CD79b и CD79b, например, путем иммунопреципитации.

Любой из указанных выше вариантов осуществления диагностики или детекции можно проводить с использованием иммуноконъюгата по изобретению вместо антитела против CD79b или дополнительно к нему.

В. Способы лечения

Антитело или иммуноконъюгат по изобретению можно использовать, например, в способах лечения *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В одном аспекте изобретение относится к способам ингибирования роста или пролиферации клеток, либо *in vivo*, либо *in vitro*, причем способ включает воздействие на клетку антитела против CD79b или его иммуноконъюгата в условиях, позволяющих связывание иммуноконъюгата с CD79b. "Ингибирование клеточного роста или пролиферации" означает снижение клеточного роста или пролиферации по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%, и включает индукцию гибели клеток. В определенных вариантах осуществления, клетка представляет собой опухолевую клетку. В определенных вариантах осуществления, клетка представляет собой В-клетку. В определенных вариантах осуществления, клетка представляет собой ксенотрансплантат, например, как проиллюстрировано в настоящем документе.

В одном аспекте антитело или иммуноконъюгат по изобретению используют для лечения или профилактики В-клеточно-пролиферативного нарушения. В определенных вариантах осуществления, клеточно-пролиферативное нарушение ассоциировано с повышенной экспрессией и/или активностью CD79b. Например, в определенных вариантах осуществления, В-клеточно-пролиферативное нарушение ассоциировано с повышенной экспрессией CD79b на поверхности В-клетки. В определенных вариантах осуществления, В-клеточно-пролиферативное нарушение представляет собой опухоль или злокачественную опухоль. Примеры В-клеточно-пролиферативных нарушений, подлежащих лечению антителами или иммуноконъюгатами по изобретению, включают, но не ограничиваются ими, лимфому, неходжкинскую лимфому (NHL), агрессивную NHL, рецидивирующую агрессивную NHL, рецидивирующую вялотекущую NHL, рефрактерную NHL, рефрактерную вялотекущую NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарную лимфому, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфому из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения В-клеточно-

пролиферативного нарушения, включающим введение индивиду эффективного количества антитела против CD79b или его иммуноконъюгата. В определенных вариантах осуществления, способ лечения В-клеточно-пролиферативного нарушения включает введение индивиду эффективного количества фармацевтического состава, содержащего антитело против CD79b или иммуноконъюгат против CD79b и, необязательно, по меньшей мере одно дополнительное лекарственное средство, такое как лекарственные средства, представленные ниже. В определенных вариантах осуществления, способ лечения клеточно-пролиферативного нарушения включает введение индивиду эффективного количества фармацевтического состава, содержащего 1) иммуноконъюгат, содержащий антитело против CD79b и цитотоксическое средство; и необязательно, 2) по меньшей мере одно дополнительное лекарственное средство, такое как средства, представленные ниже.

В одном аспекте по меньшей мере некоторые из антител или иммуноконъюгатов по изобретению могут связывать CD79b вида, отличного от человека. Таким образом, антитела или иммуноконъюгаты по изобретению можно использовать для связывания CD79b, например, в клеточной культуре, содержащей CD79b, человека или других млекопитающих, имеющих CD79b, с которым антитело или иммуноконъюгат по изобретению перекрестно реагирует (например, шимпанзе, бабуина, мартышки, яванского макака и макака-резус, свиньи или мыши). В одном варианте осуществления, антитело или иммуноконъюгат против CD79b можно использовать для нацеливания на CD79b на В-клетках путем контактирования антитела или иммуноконъюгата с CD79b с образованием комплекса антитело- или иммуноконъюгат-антиген, так что конъюгированный цитотоксин иммуноконъюгат проникает внутрь клетки. В одном варианте осуществления, CD79b представляет собой CD79b человека.

В одном варианте осуществления, антитело или иммуноконъюгат против CD79b можно использовать в способе связывания CD79b у индивида, страдающего нарушением, ассоциированным с повышенной экспрессией и/или активностью CD79b, причем способ включает введение индивиду антитела или иммуноконъюгата, так чтобы происходило связывание CD79b индивида. В одном варианте осуществления, связанное антитело или иммуноконъюгат интернализуются в В-клетку, экспрессирующую CD79b. В одном варианте осуществления, CD79b представляет собой CD79b человека, а индивидом является человек. Альтернативно индивидом может быть млекопитающее, экспрессирующее CD79b, с которым связывается антитело против CD79b. Кроме того, индивидом может быть млекопитающее, которому был введен CD79b (например, путем введения CD79b или экспрессии трансгена, кодирующего CD79b).

Антитело или иммуноконъюгат против CD79b можно вводить человеку для терапевтических целей. Более того, антитело или иммуноконъюгат против CD79b можно вводить не являющемуся человеком млекопитающему, у которого экспрессируется CD79b, с которым антитело перекрестно реагирует (например, примату, свинье, крысе или мыши) для ветеринарных целей или в качестве модели на животных для заболевания человека. В отношении последнего, такие модели для животных могут быть пригодны для оценки терапевтической эффективности антител или иммуноконъюгатов по изобретению (например, тестирования дозировок и интервалов введения).

Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению можно применять либо отдельно, либо в сочетании с другими композициями, в терапии. Например, антитело или иммуноконъюгат по изобретению можно совместно вводить по меньшей мере с одним дополнительным лекарственным средством и/или адъювантом. В определенных вариантах осуществления, дополнительное лекарственное средство представляет собой

цитотоксическое средство, химиотерапевтическое средство или ингибирующее рост средство. В одном из таких вариантов осуществления, химиотерапевтическое средство представляет собой средство или сочетание средств, например, таких как циклофосфамид, гидроксид аунорубицин, адриамицин, доксорубицин, винкристин

(OncovinTM), преднизолон, CHOP, CVP или COP, или иммунотерапевтические средства, такие как антитело против CD20 (например, Rituxan®) или антитело против VEGF (например, Avastin®), где комбинированная терапия подходит для лечения злокачественных опухолей и/или В-клеточных нарушений, таких как В-клеточно-пролиферативные нарушения, включая лимфому, неходжкинскую лимфому (NHL), агрессивную NHL, рецидивирующую агрессивную NHL, рецидивирующую вялотекущую NHL, рефрактерную NHL, рефрактерную вялотекущую NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелколимфоцитарную лимфому, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфому из клеток мантийной зоны.

Такие виды комбинированной терапии, указанные выше, охватывают комбинированное введение (где два или более лекарственных средств включены в один или в отдельные составы), и отдельное введение, в случае которого введение антитела или иммуноконъюгата по изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного лекарственного средства и/или адъюванта. Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению также можно использовать в сочетании с лучевой терапией.

Антитело или иммуноконъюгат по изобретению (и любое дополнительное лекарственное средство или адъювант) можно вводить любым подходящим способом, включая парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, если желательно для местного введения, введение в очаг повреждения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитело или иммуноконъюгат подходящим образом вводят импульсной инфузией, в частности, со снижающимися дозами антитела или иммуноконъюгата. Дозирование можно проводить любым подходящим способом, например, посредством инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, частично, от того, является ли введение кратковременным или длительным.

Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению можно изготавливать, дозировать и вводить способами, согласующимися с "Надлежащей медицинской практикой". Факторы, учитываемые в этом контексте, включают конкретное нарушение, подвергаемое лечению, конкретное млекопитающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, область доставки средства, способ введения, график введения, и другие факторы, известные врачам. Антитело или иммуноконъюгат не должны быть изготовлены, однако они необязательно изготовлены, с одним или несколькими средствами, используемыми в настоящее время для профилактики и лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антител или иммуноконъюгата, присутствующего в составе, типа нарушения или лечения, и других факторов, рассмотренных выше. Их обычно используют в тех же дозировках и с теми же способами введения, которые описаны в настоящем документе выше или в количестве приблизительно от 1 до 99% от дозировок, описанных в настоящем документе, или в любой дозировке и с любым способом, которые эмпирически/клинически определены, как подходящие.

Для профилактики или лечения заболевания, дозировка и способ введения антитела

или иммуноконъюгата по изобретению (при использовании отдельно или в сочетании с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, такими как химиотерапевтические средства) могут зависеть от типа заболевания, на которое направлено лечение, типа антитела или иммуноконъюгата, тяжести и течения

заболевания, где антитело или иммуноконъюгат вводят для профилактики или лечения, предшествующего лечению, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело или иммуноконъюгат, и от решения лечащего врача. Антитело или иммуноконъюгат подходящим образом вводят пациенту за один раз или на протяжении серии введений. В зависимости от типа и тяжести заболевания, исходная предполагаемая дозировка для введения пациенту составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг (например, приблизительно 0,1 мг/кг-20 мг/кг) антитела или иммуноконъюгата, например, либо посредством одного или нескольких отдельных введений, либо посредством непрерывной инфузии. Одна из типичных суточных дозировок может находиться в диапазоне приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Типичная суточная дозировка может варьировать приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В случае многократных введений в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, введение повторяют до возникновения требуемого подавления симптомов заболевания. Одна иллюстративная дозировка антитела или иммуноконъюгата может находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любое их сочетание) антитела или иммуноконъюгата. Такие дозы можно вводить периодически, например каждую неделю или каждые три недели (например, так чтобы пациент получал от приблизительно двух до приблизительно двенадцати, или, например, приблизительно шесть доз антитела или иммуноконъюгата). Можно вводить первоначальную более высокую нагрузочную дозу, а затем одну или несколько более низких доз. Иллюстративная схема дозирования может включать введение исходной нагрузочной дозы, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующей поддерживающей дозой антитела приблизительно 2 мг/кг каждую неделю. Однако могут быть подходящими другие схемы дозирования. Мониторинг хода этой терапии легко проводить посредством общепринятых способов и анализов.

С. Анализы активности

Антитела против CD79b и иммуноконъюгаты по изобретению могут быть охарактеризованы по их физическим/химическим свойствам и/или видам биологической активности различными анализами, известными в данной области.

1. Анализы активности

В одном аспекте предусмотрены анализы для идентификации антител против CD79b или их иммуноконъюгатов, имеющих биологическую активность. Биологическая активность может включать, например, способность ингибировать рост или пролиферацию клеток (например, активность "уничтожения клеток"), или способность индуцировать гибель клеток, включая запрограммированную гибель клеток (апоптоз). Антитела или иммуноконъюгаты, имеющие такую биологическую активность *in vivo* и/или *in vitro*, также предусматриваются.

В определенных вариантах осуществления, антитело против CD79b или его иммуноконъюгат тестируют в отношении его способности ингибировать рост или пролиферацию *in vitro*. Анализы ингибирования роста или пролиферации клеток хорошо известны в данной области. В определенных анализах пролиферации клеток,

проиллюстрированных анализами "уничтожения клеток", описанными в настоящем документе, измеряют жизнеспособность клеток. Одним из таких анализов является люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™, который является коммерчески доступным от Promega (Madison, WI). В этом анализе определяют количество жизнеспособных клеток в культуре на основании количественного определения присутствующего АТР, который является признаком метаболически активных клеток. См. Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, патент США No. 6602677. Анализ можно проводить в 96- или 384-луночном формате, что обеспечивает возможность автоматизированного высокопроизводительного скрининга (HTS). См. Cree et al. (1995) Anticancer Drugs 6:398-404. Способ анализа вовлекает добавление одного реагента (реагент CellTiter-Glo®) прямо к культивируемым клеткам. Это приводит к лизису клеток и образованию люминесцентного сигнала в реакции люциферазы. Люминесцентный сигнал пропорционален количеству присутствующего АТР, которое прямо пропорционально количеству живых клеток, присутствующих в культуре. Данные можно регистрировать на люминометре или устройстве для визуализации с камерой CCD. Выход люминесценции выражают в качестве относительных световых единиц (RLU).

Другим анализом пролиферации клеток является анализ "МТТ", колориметрический анализ, в котором измеряется окисление 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид до формазана под действием митохондриальной редуктазы. Аналогично анализу CellTiter-Glo™, этот анализ указывает на количество метаболически активных клеток, присутствующих в культуре. См., например, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, и Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

В одном аспекте антитело против CD79b тестируют в отношении его способности индуцировать гибель клеток *in vitro*. Анализы индукции гибели клеток хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления, в таких анализах измеряют, например, утрату целостности мембраны, демонстрируемую захватом йодида пропидия (PI), трипанового синего (см. Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17: 1-11) или 7AAD. В иллюстративном анализе захвата PI, клетки культивируют в модифицированной среде Дульбекко (D-MEM):Ham F-12 (50:50), дополненной 10% инактивированной нагреванием FBS (Hyclone) и 2 мМ L-глутамином. Таким образом, анализ проводят в отсутствии комплемента и иммунных эффекторных клеток. Клетки высевают с плотностью 3×10^6 на чашку в чашки 100×20 мм и позволяют прикрепляться в течение ночи. Среду удаляют и заменяют свежей средой отдельно или средой, содержащей различные концентрации антитела или иммуноконъюгата. Клетки инкубируют в течение 3 суток. После обработки монослой промывают посредством PBS и открепляют обработкой трипсином. Затем клетки центрифугируют при 1200 об./мин. в течение 5 минут при 4°C, осадок ресуспендируют в 3 мл холодного Ca^{2+} -связывающего буфера (10 мМ Hepes, pH 7,4, 140 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl_2) и разделяют на аликвоты в закрытые 35-мм сеткой пробирки 12×75 мм (1 мл на пробирку, 3 пробирки на обрабатываемую группу) для удаления клеточных кусков. Затем в пробирки добавляют PI (10 мкг/мл). Образцы анализируют с использованием проточного цитометра FACSCAN™ и программного обеспечения FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Таким образом, идентифицируют антитела или иммуноконъюгаты, которые индуцируют статистически значимые уровни гибели клеток, как определяют по захвату PI.

В одном аспекте антитело или иммуноконъюгат против CD79b тестируют в отношении их способности индуцировать апоптоз (запрограммированную гибель клеток) *in vitro*. Иллюстративный анализ антител или иммуноконъюгатов, которые индуцируют апоптоз, представляет собой анализ связывания аннексина. В иллюстративном анализе связывания аннексина, клетки культивируют и высевают в чашки, как описано в предыдущем абзаце. Среда удаляют и заменяют свежей средой отдельно или средой, содержащей от 0,001 до 10 мкг/мл антитела или иммуноконъюгата. После инкубации в течение трех суток, монослой промывают PBS и открепляют обработкой трипсином. Затем клетки центрифугируют, ресуспендируют в Ca^{2+} -связывающем буфере, и разделяют на аликвоты в пробирках, как рассмотрено в предыдущем абзаце. Затем в пробирки добавляют меченный аннексин (например, аннексин V-FITC) (1 мкг/мл). Образцы анализируют с использованием проточного цитометра FACSCANTM и программного обеспечения FACSCONVERTTM CellQuest (BD Biosciences). Таким образом, идентифицируют антитела или иммуноконъюгаты, которые индуцируют статистически значимые уровни связывания аннексина относительно контроля. Другой иллюстративный анализ антител или иммуноконъюгатов, которые индуцируют апоптоз, представляет собой колориметрический анализ ELISA с гистонной ДНК для детекции внутринуклеосомальной деградации геномной ДНК. Такой анализ можно проводить с использованием, например, набора для детекции гибели клеток посредством ELISA (Roche, Palo Alto, CA).

Клетки для применения в любом из указанных выше анализов *in vitro*, включают клетки или клеточные линии, которые естественным образом экспрессируют CD79b или которые были изменены способами инженерии, чтобы они экспрессировали CD79b. Такие клетки включают клетки опухоли, которые сверхэкспрессируют CD79b относительно нормальных клеток, происходящих из той же ткани. Такие клетки также включают клеточные линии (включая опухолевые клеточные линии), которые экспрессируют CD79b, и клеточные линии, которые в норме не экспрессируют CD79b, но которые были трансфицированы нуклеиновой кислотой, кодирующей CD79b.

В одном аспекте антитело против CD79b или его иммуноконъюгат тестируют в отношении их способности ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vivo*. В определенных вариантах осуществления, антитело против CD79b или его иммуноконъюгат тестируют в отношении их способности ингибировать рост опухоли *in vivo*. Для такого тестирования можно использовать модельные системы *in vivo*, такие как модели с ксенотрансплантатами. В иллюстративной системе с ксенотрансплантатом, опухолевые клетки человека вводят подходящему иммунодефицитному животному, не являющемуся человеком, например, мыши SCID. Антитело или иммуноконъюгат по изобретению вводят животному. Измеряют способность антитела или иммуноконъюгата ингибировать или снижать рост опухоли. В определенных вариантах осуществления указанных выше систем с ксенотрансплантатами, опухолевые клетки человека представляют собой клетки опухоли от пациента-человека. Такие клетки, подходящие для получения моделей с ксенотрансплантатами, включают клеточные линии лейкоза и лимфомы человека, которые включают, но не ограничиваются ими, клетки BJAB-luc (EBV-отрицательную клеточную линию лимфомы Беркитта, трансфицированную репортерным геном люциферазы), клетки Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), клетки SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495), клетки DoHH2 (см. Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991), и Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8: 1385-1391 (1994)), клетки Granta-519 (см. Jadayel, D.M. et al., Leukemia 11(1):64-72 (1997)). В

определенных вариантах осуществления, клетки опухоли человека вводят подходящему иммунодефицитному животному, не являющемуся человеком, путем подкожной инъекции или посредством трансплантации в подходящую область, такую как жировое тело молочной железы.

2. Анализы связывания и другие способы анализа

В одном аспекте антитело против CD79b тестируют в отношении его антиген-связывающей активности. Например, в определенных вариантах осуществления, антитело против CD79b тестируют в отношении его способности связывать CD79b, экспрессированный на поверхности клетки. Для такого тестирования можно

использовать анализ FACS.

В одном аспекте можно использовать конкурентные анализы для идентификации моноклонального антитела, которое конкурирует с антителом против 2F2 мыши и/или гуманизированным антителом 2F2.D7 за связывание с CD79b. В определенных вариантах осуществления, такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связывается антителом 2F2 мыши и/или гуманизированным антителом 2F2.D7. Иллюстративные конкурентные анализы включают, но не ограничиваются ими, общепринятые анализы, такие как анализы, представленные в Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Подробное описание иллюстративных способов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, предоставлено в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Два антитела считают связывающимися с одним эпитопом, если каждое из них блокирует связывание другого на 50% или более.

В иллюстративном конкурентном анализе, иммобилизованный CD79b инкубируют в растворе, содержащем первое меченное антитело, которое связывается с CD79b (например, антитело 2F2 мыши и/или гуманизированное антитело 2F2.D7) и второе немеченое антитело, которое подвергают тестированию в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с CD79b. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля, иммобилизованный CD79b инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, позволяющих связывание первого антитела с CD79b, избыток не связавшегося антитела удаляют, и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным CD79b. Если количество метки, связанной с иммобилизованным CD79b, является по существу сниженным в тестируемом образце относительно контрольного образца, тогда это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с CD79b. В определенных вариантах осуществления, иммобилизованный CD79b присутствует на поверхности клетки или в мембранном препарате, полученном из клетки, экспрессирующей CD79b на своей поверхности.

В одном аспекте очищенные антитела против CD79b могут быть далее охарактеризованы серией анализов, включающих, но не ограничивающихся ими, N-концевое секвенирование, анализ аминокислот, гель-фильтрацию в неденатурирующих условиях, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), масс-спектрометрию, ионообменную хроматографию и расщепление папаином.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к измененному антителу, которое обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают его желательным кандидатом для множества применений, в которых является важным время полужизни антитела *in vivo*, но также определенные эффекторные функции (такие

как комплемент-зависимая цитотоксичность и ADCC) являются необязательными или вредными. В определенных вариантах осуществления, измеряют активность Fc антитела для того, чтобы убедиться, что сохраняются только требуемые свойства. Можно проводить анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения снижения/5 устранения активности в отношении CDC и/или ADCC. Например, можно проводить анализы связывания Fc-рецепторов (FcR), чтобы убедиться, что антитело лишено связывания FcγR (таким образом, вероятно лишено активности в отношении ADCC), но сохраняет способность связывать FcRn. Основные клетки для осуществления ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют10 FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках представлена в таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Пример анализа *in vitro* для оценки активности, представляющей интерес молекулы в отношении ADCC описан в патентах США No. 5500362 или 5821337. Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают периферические мононуклеарные клетки крови (PBMC)15 и естественные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или дополнительно, активность представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описана в Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Также можно проводить анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело неспособно связывать C1q и, таким образом, лишено активности CDC.20 Для оценки активации комплемента, можно проводить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). Определение связывания FcRn и выведения/времени полужизни *in vivo* также можно проводить с использованием способов, известных в данной области.

Представленные ниже примеры приведены только для иллюстративных целей, и не25 предназначены для ограничения объема настоящего изобретения никоим образом.

Все патентные и литературные ссылки, цитированные в настоящем описании, включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме.

ПРИМЕРЫ

Коммерчески доступные реагенты, указанные в примерах, использовали в30 соответствии с инструкциями изготовителя, если нет иных указаний. Антитела, используемые в примерах, включают коммерчески доступные антитела. Источником этих клеток, идентифицированных в представленных ниже примерах и на протяжении описания под регистрационными номерами ATCC, является American Type Culture Collection, Manassas, VA.

ПРИМЕР 1: Получение гуманизированного антитела против CD79b

Номера остатков соответствуют Кабат (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Используют однобуквенные сокращения аминокислот. Вырожденность ДНК представлена с использованием кода IUB (N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/C/T, K=G/T, M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T).40

Химерное антитело 2F2 (обозначаемое в настоящем документе как "ch2F2") получали, как описано ранее в заявке США No. 11/462336, поданной 3 августа 2006 года.

А. Гуманизированное антитело против CD79b с пересаженной последовательностью

Получали гуманизированное антитело против CD79b. VL- и VH-домены из антитела45 2F2 мыши (mu2F2) выравнивали с консенсусным доменом VL каппа I человека (huKI) и консенсусным доменом VH подгруппы III человека (huIII). Для встраивания пересаживаемой HVR использовали акцепторную каркасную область VH, которая отличается от консенсусного домена VH подгруппы III человека в 3 положениях: R71A,

N73T и L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). Гипервариабельные области из антитела 2F2 мыши (mu2F2) встраивали в акцепторную консенсусную каркасную область человека с получением непосредственно 2F2 с пересаженными HVR (обозначаемого в настоящем документе как "2F2 с пересаженной последовательностью" или "гуманизированное" антитело с пересаженной последовательностью 2F2" или "hu2F2 с пересаженной последовательностью"). В VL-домене следующие участки были пересажены в консенсусную акцепторную последовательность человека: положения 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) (фигура 7). В VH-домене пересаживали положения 26-35 (H1), 49-65 (H2) и 93-102 (H3) (фигуры 8A и 8B). MacCallum et al. (MacCallum et al., J. Mol. Biol, 262: 732-745 (1996)) анализировали кристаллические структуры комплекса антитела и антигена и выявили, что положения 49, 93 и 94 тяжелой цепи являются частью области контакта, и, таким образом, их включают в определение HVR-H2 и HVR-H3 при гуманизации антитела.

Вариант с прямо пересаженной последовательностью (2F2 с пересаженной последовательностью) получали мутагенезом Kunkel, как в качестве Fab, экспонированного на фаге, так и в качестве IgG, с использованием отдельного олигонуклеотида для каждой гипервариабельной области. Правильные клоны оценивали секвенированием ДНК.

В. Варианты гуманизированного антитела против CD79b с пересаженной последовательностью

Варианты антитела против CD79b с пересаженной последовательностью, которые включали мутационное разнообразие в гипервариабельных областях "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2, создавали с использованием фаговых библиотек. Варианты антитела против CD79b с пересаженной последовательностью включали варианты по множеству положений в HVR (фигура 9).

С. Фаговая селекция

Для фаговой селекции, huCD79b_{ecd} (2 мкг/мл) иммобилизовывали в PBS на микропланшетах для титрования MaxiSorp (Nunc) в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали в течение по меньшей мере 1 ч с использованием блокирующего средства на основе казеина (Pierce). Фаг собирали из культурального супернатанта и суспендировали в PBS, содержащем 0,5% BSA и 0,05% Tween 20 (PBSBT). После добавления фаговой библиотеки и фаговой селекции в течение 2 ч, лунки для микротитрования тщательно промывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20 (PBST) для удаления не связавшегося фага, и связавшийся фаг элюировали посредством инкубации лунок с 100 мМ HCl в течение 30 мин. Жесткость селекции можно повышать в ходе последовательных раундов селекции путем повышения количества промываний PBST или путем инкубации с растворимым huCD79b_{ecd} в течение увеличенных периодов времени перед элюированием.

Элюированный фаг нейтрализовывали 1M Tris, pH 8 и амплифицировали с использованием клеток XLI-Blue и фага-помощника M13/KO7 и выращивали в течение ночи при 37°C в 2YT, 50 мкг/мл карбенациллина. Титры фага, элюированные с содержащей мишень лунки, сравнивали с титрами фага, полученными для не содержащей мишень лунки, для оценки увеличения его содержания.

Д. Продукция Fab и продукция IgG

Для экспрессии белка Fab в целях измерения аффинности, в вектор для фагового дисплея встраивали стоп-кодон между тяжелой цепью и g3. Клоны трансформировали в клетки *E. coli* 34B8 и выращивали в полной среде C.R.A.P. при 30°C (Presta et al. Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Клетки собирали центрифугированием, суспендировали в

PBS, 100 мкМ PMSF, 100 мкМ бензамидине, 2,4 мМ EDTA и разрушали с использованием микрофлуидизатора. Fab очищали аффинной хроматографией с белком G.

Для целей скрининга сначала получали варианты IgG в клетках 293. Векторы, кодирующие VL и VH (25 мкг), трансфицировали в клетки 293 с использованием системы FuGene. 500 мкл FuGene смешивали с 4,5 мл среды DMEM, не содержащей FBS, и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. К этой смеси добавляли каждую цепь (25 мкг) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, а затем переносили во флакон для трансфекции на ночь при 37°C в 5% CO₂. На следующие сутки среду, содержащую смесь для трансфекции, удаляли и заменяли 23 мл среды PS04 с 0,1 мл/л микроэлементов и 10 мг/л инсулина. Клетки инкубировали в течение дополнительных 5 суток, после чего среду собирали при 1000 об./мин. в течение 5 мин и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,22-мкм фильтра с низким связыванием белка. Образцы можно было хранить при 4°C после добавления 2,5 мл 0,1% PMSF на каждые 125 мл среды.

Е. Определение аффинности (анализ Biacore)

Для определения аффинности вариантов "гуманизированного" антитела 2F2 с пересаженной последовательностью, внеклеточный домен CD79b человека (huCD79b_{ecd}) экспрессировали в клетках CHO отдельно или в форме, слитой с Fc (huCD79b_{ecd}-Fc) и очищали общепринятыми способами. Кроме того, синтезировали пептид из 16 аминокислот (ARSEDYRNPCKGSACK) (SEQ ID NO:78), содержащий эпитоп для 2F2, общепринятыми способами.

Охарактеризация эпитопа для антитела 2F2 (обозначенного как "тестируемый пептид" на фигуре 14) была ранее описана в заявке США No. 11/462336, поданной 3 августа 2006 года. Эпитоп для антитела 2F2 расположен во внеклеточной области пептида, дистальнее трансмембранного домена, и он представлен в полноразмерной и укороченной формах CD79b человека (Cragg, Blood, 100(9): 3068-76 (2002)), которые были описаны для нормальных и злокачественных В-клеток (Hashimoto, S. et al., Mol. Immunol, 32(9): 651-9 (1995); Alfarano et al., Blood, 93(7): 2327-35 (1999)). Укороченная форма CD79b лишена целого внеклеточного Ig-подобного домена (внеклеточный Ig-подобный домен, который не присутствует в сплайсированной укороченной форме CD79b, заключен в рамку на фигуре 14).

Связывание Fab- и IgG-вариантов ch2F2, "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2 с пересаженной последовательностью) или варианта 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2.D7) с иммобилизованным huCD79b_{ecd} или CD79b-Fc или пептидом из 16 аминокислот, содержащим эпитоп для 2F2, измеряли посредством поверхностного плазмонного резонанса. Определение аффинности проводили посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcoreTM-2000. Антиген, huCD79b_{ecd} или huCD79b-Fc иммобилизовывали (приблизительно 50 - 200 RU) в 10 мМ ацетате натрия pH 4,8 на сенсорном чипе CM5. В экспериментах, в которых измеряли связывание с пептидом из 16 аминокислот (ARSEDYRNPCKGSACK) (SEQ ID NO:78), содержащим эпитоп (аминокислоты 1-11 SEQ ID NO:78) для 2F2, биотинилированный пептид улавливали (приблизительно 20 RU) на покрытом стрептавидином сенсорном чипе. Очищенный вариант "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (в качестве Fab или IgG) (2-кратное серийное разведение от 0,5 до 1000 нМ в PBST) инъецировали со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец

анализировали при ассоциации в течение 4 минут и диссоциации в течение 10 минут. После каждой инъекции чип регенерировали с использованием 10 мМ глицина pH 1,7.

Связывающий ответ корректировали вычитанием значения контрольной проточной ячейки из значений проточных ячеек варианта "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (в виде Fab или IgG). Для анализа кинетики использовали модель Ленгмюра 1:1 для одновременного приведения в соответствие k_{on} и k_{off} .

F. Анализ связывания (Анализ FACS)

Для дальнейшего определения связывания варианта 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2.D7), полученного из библиотек SR, с клетками BJAB, связывание меченых антител hu2F2.D7 (варианты IgG) с клетками BJAB анализировали с использованием анализа FACS.

Для анализа FACS, моноклональные антитела ch2F2 и 2F2.D7 метили с помощью набора Zenon® Alexa Fluor® 488 Human IgG Labeling Kit (Invitrogen, Carlsbad, California), в соответствии с инструкциями изготовителя. Клетки BJAB (1×10^6 в объеме 100 мкл) окрашивали 1 мкг каждого из меченых антител: изотипический hIgG1, ch2F2 или 2F2.D7.

G. Определение аффинности (анализ Скэтчарда)

Для дальнейшего определения связывания IgG-вариантов варианта 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2.D7), имеющего замены в HVR-L3, анализировали связывание йодированного антитела против CD79b (с тем же эпитопом, что и ch2F2) с клетками BJAB, экспрессирующими CD79b человека и CD79b яванского макака, с использованием конкуренции с немеченым ch2F2 и проводили анализ Скэтчарда.

Для анализа Скэтчарда, 0,5 нМ меченного I^{125} антитела против CD79b человека с тем же эпитопом, что и у ch2F2, или 0,5 нМ меченного I^{125} варианта 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2.D7) подвергали конкуренции против немеченого ch2F2 или hu2F2.D7, соответственно, в диапазоне от 50 до 0,02 нМ (12 стадий серийных разведений 1:2) в присутствии трансфицированной линии BJAB, стабильно экспрессирующей CD79b яванского макака и эндогенный CD79b человека. После инкубации в течение четырех часов при 4°C, клетки промывали и проводили их подсчет в клеточном осадке с помощью гамма-счетчика (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Все точки получали в трех экземплярах и подсчитывали в течение 10 минут. Для вычисления Kd использовали среднее значение CPM с использованием программы New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA).

Результаты и обсуждение

A. Результаты образования гуманизированного антитела против CD79b

Акцепторная каркасная область человека, используемая для получения гуманизированного антитела против CD79b содержит консенсусный домен VL каппа I человека и вариант консенсусного домена VH подгруппы III человека. Вариант VH-домена имел 3 замены относительно консенсусной последовательности человека: R71A, N73T и L78A. VL- и VH-домены 2F2 мыши (mu2F2) выравнивали с доменами каппа I и подгруппы III человека; идентифицировали каждую HVR, а затем пересаживали в акцепторную каркасную область человека для получения пересаженной HVR, которая могла быть экспонирована в качестве Fab на фаге (фигуры 7 и 8).

Фаг, экспонирующий пересаженную последовательность 2F2 в виде Fab, не связывался с иммобилизованным huCD79b_{ecd} (данные не представлены). Кроме того, пересаженная

последовательность 2F2 в виде Fab не связывала huCD79b_{ecd}, и пересаженная последовательность 2F2 в виде Fab или в качестве Ig не связывала huCD79b_{ecd}-Fc (фигура 10, NB = нет связывания), при определении анализом Biacore.

1. Восстановление CDR

Идентифицировали варианты "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2, которые были способны связываться с иммобилизованным huCD79b_{ecd} со следующими изменениями последовательности.

В библиотеках, содержащих множество изменений положений, наблюдали только изменения последовательностей, нацеленные на HVR в L3, и они представлены на фигуре 9 (для мутации L3: W89F и Y96F (мутация 2F2.D7) (SEQ ID NO:18).

Выбранные клоны преобразовывали в форму Fab для анализа FACS и в форму IgG для последующего анализа Biacore и Скэтчарда.

a. Определение аффинности (анализ Biacore)

Как представлено на фигуре 10, на которой показан анализ Biacore, этот подход с восстановлением CDR идентифицировал изменения последовательности в HVR-L3 (hu2F2.D7), которые восстанавливают аффинность "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2. Анализы поверхностного плазмонного резонанса показали, что изменения в L3 (hu2F2.D7) имели сходную аффинность (фигура 10) с ch2F2 при связывании с иммобилизованным huCD79b_{ecd} или пептидом из 16 аминокислот (SEQ ID NO:78), содержащим эпитоп (аминокислоты 1-11 SEQ ID NO:78) для 2F2, как определили анализом Biacore.

b. Определение аффинности (анализ Скэтчарда)

Как оценили анализом Скэтчарда, этот подход с восстановлением CDR идентифицировал изменения последовательности, которые повышали аффинность "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2. Конкретно, анализы клеточного связывания показали, что аффинность ch2F2 и варианта 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2.D7) (преобразованного в форму IgG) в отношении связывания клеток BJAB, стабильно экспрессирующих CD79b яванского макака и эндогенный CD79b человека, имела значения K_d, составляющие 1 нМ (ch2F2; K_d=0,99±0,23 нМ) и 2 нМ (hu2F2.D7; K_d=2,0±0,53 нМ), соответственно (данные не представлены), при определении анализом Скэтчарда.

c. Определение связывания (анализ FACS)

Как оценивали анализом FACS, этот подход с восстановлением CDR идентифицировал изменения последовательности, которые повышали связывание "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (hu2F2 с пересаженной последовательностью) с клетками BJAB (данные не представлены). Конкретно, анализ FACS моноклональных hu2F2.D7 (варианты IgG), идентифицированных из фаговых библиотек, с клетками BJAB, показал связывание варианта hu2F2.D7 с клетками BJAB (данные не представлены).

В. Обсуждение иммунизации антител 2F2

Начиная с пересадки 6 HVR 2F2 мыши (определенных как положения 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) и 93-102 (H3)) в консенсусную VL каппа I и подгруппы VH III человека (содержащую A71, T73 и A78), использовали восстановление CDR для идентификации изменений в HVR 1-6, которые повышают аффинность связывания. Изменения последовательности HVR, идентифицированные на фигуре 10, привели к гуманизированным вариантам 2F2 с аффинностью, сходной с ch2F2.

ПРИМЕР 2: Получение конъюгатов антител против CD79b-лекарственное средство (ADC)

Для тестирования эффективности IgG-вариантов "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2, варианты "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 конъюгировали с лекарственными средствами, такими как DM1. Варианты, конъюгированные с DM1, включали варианты, имеющие изменения в HVR-L3.

Лекарственные средства, используемые для получения конъюгатов антител-лекарственное средство (ADC), для антител против CD79b включали майтанзиноид DM1 и могли включать производные доластатина, монометилауристатин E (MMAE) и монометилауристатин F (MMAF). (См. US2005/0276812; US 2005/0238649; Doronina et al., *Bioconjug. Chem.*, 17:114-123 (2006)), DM1, MMAE и MMAF являются ингибиторами митоза, которые являются по меньшей мере в 100 раз более цитотоксичными, чем ингибиторы митоза на основе алкалоидов барвинка, используемые при химиотерапевтическом лечении NHL (Doronina et al., *Bioconjug. Chem.*, 17: 114-123 (2006); Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003); Erickson et al., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006), все из которых включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме). Линкеры, подходящие для получения ADC, представляют собой BMPEO, SPP или SMCC (также обозначаемые в настоящем документе как "MCC") для DM1 и MC, или MC-vc-PAB для MMAE и MMAF. В случае DM1, антитела связывали с тиогруппой DM1 и через ϵ -аминогруппу лизина с использованием линкерного реагента SMCC. Альтернативно, в случае DM1, антитела можно связывать с DM1 через ϵ -аминогруппу лизина с использованием линкера SPP. SPP (N-сукцинимидил-4-(2'-пиридилдитио) пентаноат) реагирует с эпсилон-аминогруппой остатков лизина, оставляя реакционно-способный 2-пиридилдисульфидный линкер на белке. В случае с линкером SPP, при реакции со свободным сульфгидрилом (например, DM1), пиридилная группа вытесняется, оставляя DM1, связанный через поддающуюся восстановлению дисульфидную связь. DM1, связанный через линкер SPP, высвобождается в восстанавливающих условиях (т.е., например, в клетках), а DM1, связанный через линкер SMCC, является устойчивым к расщеплению в восстанавливающих условиях. Кроме того, ADC SMCC-DM1 индуцируют токсичность клеток, если ADC интернализуется и направляется в лизосому, вызывая высвобождение лизин- N^{ϵ} -DM1, который представляет собой эффективное антимиотическое средство внутри клетки, и когда он высвобождается из клетки, лизин- N^{ϵ} -DM1 является нетоксичным (Erickson et al., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006)). В случае MMAE и MMAF, антитела можно связывать с MMAE или MMAF через цистеин посредством малеимидокапроил-валин-цитрулин-(vc)-п-аминобензилоксикарбонила (MC-vc-PAB). В случае MMAF, антитела альтернативно можно связывать с MMAF через цистеин посредством малеимидокапроильного (MC) линкера. Линкер MC-vc-PAB поддается расщеплению внутриклеточными протеазами, такими как катепсин В, и при расщеплении высвобождает свободное лекарственное средство (Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003)), в то время как линкер MC является устойчивым к расщеплению внутриклеточными протеазами.

Конъюгаты антител-лекарственное средство (ADC) для антитела против CD79b, в которых используется SMCC-DM1, получали, аналогично способу, описанному в US2005/0276812. Очищенные антитела против CD79b подвергали замене буфера в растворе, содержащем 50 мМ фосфат калия и 2 мМ EDTA, pH 7,0. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) растворяли в диметилацетамиде (DMA) и добавляли в раствор антитела с получением конечного молярного отношения SMCC/Ab, составляющего 10:

1. Реакции позволяли протекать в течение трех часов при комнатной температуре при перемешивании. Затем модифицированное посредством SMCC антитело очищали на колонке для обессоливания GE Healthcare HiTrap (G-25), уравновешенной в 35 мМ цитрате натрия с 150 мМ NaCl и 2 мМ EDTA, pH 6,0. В препарат антитела и SMCC добавляли DM1, растворенный в DMA, до молярного соотношения DM1 к антителу 10:1. Реакции позволяли протекать в течение 4-20 ч при комнатной температуре при перемешивании. Раствор модифицированного DM1 антитела подвергали диафильтрации с 20 объемами PBS для удаления не вступившего в реакцию DM1, подвергали стерильной фильтрации, и хранили при 4°C. Как правило, посредством этого процесса достигали выхода антитела, составлявшего 40-60%. Препарат, как правило, был >95% мономерным согласно оценке гель-фильтрацией и рассеянием лазерного излучения. Поскольку DM1 имел максимум поглощения при 252 нм, количество лекарственного средства, связанного с антителом, можно было определять дифференциальным измерением поглощения при 252 и 280 нм. Как правило, соотношение лекарственного средства и антитела составляло от 3 до 4.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) для антител против CD79b, описанных в настоящем документе, в которых используется линкер SPP-DM1, можно получать аналогично способу, описанному в US 2005/0276812. Очищенные антитела против CD79b подвергали замене буфера в растворе, содержащем 50 мМ фосфат калия и 2 мМ EDTA, pH 7,0. SPP (Immunogen) растворяли в DMA и добавляли в раствор антитела до получения конечного молярного отношения SPP/Ab, составляющего приблизительно 10:1, причем точное отношение зависит от требуемой нагрузки антитела лекарственным средством. Отношение 10:1, как правило, приводит к отношению лекарственного средства к антителу, составляющему приблизительно 3-4. SPP позволяли реагировать в течение 3-4 часов при комнатной температуре при перемешивании. Затем модифицированное SPP антитело очищали на колонке для обессоливания GE Healthcare HiTrap (G-25), уравновешенной в 35 мМ цитрате натрия с 150 мМ NaCl и 2 мМ EDTA, pH 6,0 или фосфатно-солевым буфере, pH 7,4. DM1 растворяли в DMA и добавляли в препарат SPP и антитела до молярного отношения DM1 к антителу 10:1, которое приводит к 3-4-кратному молярному избытку относительно доступных линкеров SPP на антителе. Реакции с DM1 позволяли протекать в течение 4-20 ч при комнатной температуре при перемешивании. Раствор модифицированного DM1 антитела подвергали диафильтрации с 20 объемами PBS для удаления не вступившего в реакцию DM1, подвергали стерильной фильтрации, и хранили при 4°C. Как правило, в этом процессе достигали выхода антитела 40-60% или более. Препарат, как правило, был >95% мономерным согласно оценке гель-фильтрацией и рассеянием лазерного излучения. Количество связанного лекарственного средства определяли дифференциальным измерением поглощения при 252 и 280 нм, как описано для препарата конъюгатов SMCC-DM1 (описанного выше).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) для антител против CD79b, описанных в настоящем документе, в которых используются линкеры для лекарственного средства MC-MMAF, MC-MMAE, MC-val-cit(vc)-PAB-MMAE или MC-val-cit(vc)-PAB-MMAF, также можно получать аналогично способу, описанному в US 2005/0238649. Очищенное антитело против CD79b растворяют в 500 мМ борате натрия и 500 мМ хлориде натрия при pH 8,0 и далее обрабатывают избытком 100 мМ дитиотреитола (DTT). После инкубации при 37°C в течение приблизительно 30 минут проводят замену буфера элюированием через смолу Sephadex G25 и элюируют PBS с 1 мМ DTPA. Значение тиол/Ab проверяют определением концентрации восстановленного

антитела из поглощения раствора при 280 нм и концентрации тиола посредством реакции с DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) и определения поглощения при 412 нм. Восстановленное антитело растворяют в PBS и охлаждают на льду. Линкер лекарственного средства, например, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE, в DMSO, растворяют в ацетонитриле и воде, и добавляют к охлажденному восстановленному антителу в PBS. После инкубации в течение часа, добавляют избыток малеимида для гашения реакции и закрытия каких-либо не вступивших в реакцию тиольных групп антитела. Реакционную смесь концентрируют ультрафильтрацией центрифугированием и конъюгат антитело-лекарственное средство очищают и подвергают обессоливанию путем элюирования через смолу G25 в PBS, фильтруют через 0,2-мкм фильтры в стерильных условиях и замораживают для хранения.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (с использованием антитела против CD79b, описанного в настоящем документе) разбавляли до 2×10 мкг/мл в среде для анализа. Конъюгаты связывали с сшивающими линкерами SMCC (для SPP для токсина майтанзиноида DM1 можно использовать альтернативный дисульфидный линкер) (См. US 2005/0276812 и US 2005/0238649). Кроме того, конъюгаты можно связывать с MC-валин-цитруллин(vc)-PAB или MC для производных долостатина10, токсина монометилауристатина E (MMAE) или токсина монометилауристатина F (MMAF) (см. заявку США No. 11/141344, поданную 31 мая 2005 года, и заявку США No. 10/983340, поданную 5 ноября 2004 года). Отрицательные контроли включали конъюгаты на основе HERCEPTIN® (трастузумаб) (антитело против HER2) (SMCC-DM1 или SPP-DM1 или MC-vc-MMAE или MC-vc-MMAF). Положительные контроли могли включать свободный L-DM1, эквивалентный нагрузочной дозе конъюгата. Образцы встряхивали для обеспечения гомогенной смеси перед разбавлением.

Антитела против CD79b для конъюгации с лекарственным средством включали химерные антитела 2F2 (описанные в примере 1A) и антитела, дополнительно описанные в настоящем документе (см. пример 1), включая hu2F2.D7.

ПРИМЕР 3: Анализ уничтожения опухолевых клеток *in vivo*

А. Ксенотрансплантаты

Для тестирования эффективности IgG-вариантов "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2, имеющих изменения в HVR-L3 (hu2F2.D7), вариант hu2F2.D7 конъюгировали с DM1 и анализировали эффект конъюгированного варианта на опухоли у мышей.

Конкретно, исследовали способность антител вызывать регрессию опухолей в различных моделях с ксенотрансплантатами, включая клетки RAMOS, клетки BJAB (клеточная линия лимфомы Беркитта, которая содержит транслокацию t(2;8)(p11;q24) (IGK-MYC), мутантный ген p53 и является отрицательной по вирусу Эпштейна-Барр (EBV)) (Drexler, H. G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), клетки Granta 519 (клеточная линия лимфомы из клеток мантийной зоны, которая содержит транслокацию t(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH), которая приводит к сверхэкспрессии циклина D1 (BCL1), содержит делеции P16INK4B и P16INK4A и является положительной по EBV) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), клетки U698M (В-клеточная линия лимфобластной лимфосаркомы; (Drexler, H. G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001) и клетки DoHH2 (клеточная линия фолликулярной лимфомы, которая содержит транслокацию, характерную для фолликулярной лимфомы t(14;18) (q32;q21), которая приводит к сверхэкспрессии Bcl-2, направляемой тяжелой цепью Ig, содержит делецию P16INK4A, содержит транслокацию t(8;14)(q24;q32) (IGH-MYC) и

является отрицательной по EBV) (Drexler, H. G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)).

Для анализа эффективности вариантов "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2, самкам мышей CB17 ICR SCID (в возрасте 6-8 недель от

Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) инокулировали подкожно 2×10^7 клеток BJAB-люциферазы или клеток Granta-519 посредством инъекции в бока мышей CB17 ICR SCID и ксенотрансплантированным опухолям позволяли расти до размера в среднем 200 мм². Сутки 0 относятся к суткам, когда размер опухоли составлял в среднем 200 мм² и когда вводили первую/или единственную дозу вводимого средства, если нет иных конкретных указаний ниже. Размер опухоли вычисляли, исходя из двух размеров, измеренных с использованием штангенциркуля, и его выражали в мм³ согласно формуле:

$V = 0,5 \times a \times b^2$, где а и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Данные, полученные для каждой экспериментальной группы, выражали в качестве средних значений $\pm SE$. В группах из 10 мышей проводили введение однократной внутривенной (i.v.) дозы, составляющей между 50 и 210 мкг связанного с антителом лекарственного средства/м² мыши (соответствующую на ~1-4 мг/кг мыши), с вариантами "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 или контрольными конъюгатами антитело-лекарственное средство. Опухоли измеряли либо один, либо два раза в неделю на протяжении эксперимента. Массу тела мышей измеряли либо один, либо два раза в неделю на протяжении эксперимента.

Мышей умерщвляли до достижения опухолью объема 3000 мм³ или когда в опухоли наблюдали признаки предстоящего изъязвления. Все протоколы на животных были одобрены Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Линкеры между антителом и токсином, которые использовали, представляли собой простой тиоэфирный сшивающий линкер SMCC для DM1. Дополнительные линкеры могут включать дисульфидный линкер SPP или простой тиоэфирный сшивающий линкер SMCC для DM1 или MC или MC-валин-цитруллин(vc)-PAB (или дипептидный линкерный реагент валин-цитруллин(vc))), имеющий малеимидный компонент и пара-аминобензилкарбамоильный (PAB) самоотщепляющийся компонент для монометилауристатина E (MMAE) или монометилауристатина F (MMAF). Используемые токсины представляли собой DM1. Дополнительные токсины могут включать MMAE или MMAF.

Антитела против CD79b для этого эксперимента включали химерные антитела 2F2 (ch2F2), как описано в заявке США No. 11/462336, поданной 3 августа 2006 года (см. пример 1A), а также варианты "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2, описанные в настоящем документе (см. пример 1). Дополнительные антитела могут включать антитела 2F2, полученные из гибридом, депонированных в ATCC в качестве РТА-7712 11 июля 2006 года.

Отрицательные контроли включали конъюгаты на основе HERCEPTIN® (трастузумаб) (антитело против HER2) (SMCC-DM1).

В. Результаты

1. Ксенотрансплантаты BJAB-люцифераза

В течение 36 суток вариант 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (вариант hu2F2.D7) (преобразованный в форму IgG) (и химерное антитело против CD79b (ch2F2), конъюгированное с DM1 (hu2F2.D7-SMCC-DM1 и ch2F2-SMCC-DM1, соответственно), показал ингибирование роста опухоли у

мышей SCID с опухолями BJAB-люцифераза по сравнению с отрицательным контролем, HERCEPTIN® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (антитело против HER2-SMCC-DM1). ADC вводили в виде однократной дозы (как указано в таблице 7) на 0 сутки для всех ADC и контролей. Конкретно, антитела hu2F2.D7-SMCC-DM1 (преобразованные в форму IgG) и ch2F2-SMCC-DM1 значительно ингибировали рост опухоли (фигура 19). Кроме того, в таблице 7 указано количество мышей из общего протестированного количества, показывающих PR = частичная регрессия (где объем опухоли в любое время после введения снижался до уровня ниже 50% от объема опухоли, измеренного на 0 сутки) или CR = полная ремиссия (где объем опухоли в любое время после введения снижался до 0 мм³).

Таблица 7:
Ксенотрансплантат BJAB-Лус (20 миллионов клеток/мышь) у мышей SCID

Вводимое антитело (лечение)	PR	CR	Доза Ab (мг/кг)	Доза лекарственного средства-DM1 (мкг/м ²)	Отношение лекарственного средства (Лекарственное средство/Ab)
Контрольное антитело против HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	2	100	3,3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	1/10	2,3	100	3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	0/10	1,2	50	3
hu2F2.D7-SMCC-DM1	1/10	1/10	2,9	100	2,3
hu2F2.D7-SMCC-DM1	1/10	0/10	1,5	50	2,3

2. Ксенотрансплантаты Granta-519 (лимфома из клеток мантийной зоны человека)

В течение 14 суток, вариант 7 "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 (вариант hu2F2.D7) (преобразованный в форму IgG) (hu2F2.D7-SMCC-DM1), показал ингибирование роста опухоли у мышей SCID с опухолями Granta-519 по сравнению с отрицательным контролем, HERCEPTIN® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (антитело против HER2-SMCC-DM1). ADC вводили в однократной дозе (как указано в таблице 8) на 0 сутки для всех ADC и контролей. Конкретно, антитела hu2F2.D7-SMCC-DM1 (преобразованные в форму IgG) значительно ингибировали рост опухоли (фигура 20A).

Кроме того, введение hu2F2.D7-SMCC-DM1 и контрольного HERCEPTIN® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (антитело против HER2-SMCC-DM1) не приводило к снижению процентной массы тела мышей (фигура 20B). Более того, в таблице 8 указано число мышей из общего числа тестируемых мышей, показывающих PR = частичная регрессия (где объем опухоли в любое время после введения снижался до уровня ниже 50% от объема опухоли, измеренного на 0 сутки) или CR = полная ремиссия (где объем опухоли в любое время после введения снижался до 0 мм³).

Таблица 8:
Ксенотрансплантат Granta-519 (20 миллионов клеток/мышь) у мышей SCID

Вводимое антитело (лечение)	PR	CR	Доза Ab (мг/кг)	Доза лекарственного средства-DM1 (мкг/м ²)	Отношение лекарственного средства (Лекарственное средство/Ab)
Контрольное антитело против HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	206	3,4
hu2F2.D7-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	166	2,8

Ввиду способности ADC "гуманизированного" антитела с пересаженной последовательностью 2F2 значительно ингибировать прогрессирование опухоли в ксенотрансплантатах, молекулы CD79b могут быть превосходными мишенями для терапии опухолей у млекопитающих, включая ассоциированные с В-клетками злокачественные опухоли, такие как лимфомы (т.е. неходжсинская лимфома), лейкозы

(т.е. хронический лимфоцитарный лейкоз) и другие злокачественные опухоли кроветворных клеток. Кроме того, ADC "гуманизированного" с пересаженной последовательностью 2F2 подходят для снижения роста опухоли *in vivo* в опухолях, включающих ассоциированные с В-клетками злокачественные опухоли, такие как

5 лимфомы (т.е. неходжкинская лимфома), лейкозы (т.е. хронический лимфоцитарный лейкоз), и другие злокачественные опухоли кроветворных клеток.

ПРИМЕР 4: Колокализация антитела против CD79b

Для определения случаев, когда "гуманизированные" антитела с пересаженной 2F2 и варианты антител доставляются путем интернализации в клетку, можно проводить

10 исследования колокализации антител против CD79b, интернализованных в В-клеточные линии, в клеточных линиях Ramos. LAMP-1 представляет собой маркер эндосом и лизосом (Kleijmeer et al., Journal of Cell Biology, 139(3): 639-649 (1997); Hunziker et al., Bioessays, 18:379-389 (1996); Mellman et al., Annu. Rev. Dev. Biology, 12:575-625 (1996)), включая компартмент МНС класса II (МПС), который представляет собой поздний

15 эндосома/лизосома-подобный компартмент. HLA-DM представляет собой маркер для МПС.

Клетки Ramos инкубируют в течение 3 часов при 37°C с 1 мкг/мл "гуманизированных" антител с пересаженной последовательностью 2F2 и вариантов антител, с блокирующим FcR средством (Miltenyi) и 25 мкг/мл Alexa647-трансферрина (Molecular Probes) в полной

20 не содержащей карбонатов среде (Gibco) в присутствии 10 мкг/мл леупептина (Roche) и 5 мкМ пепстатина (Roche) для ингибирования деградации лизосом. Затем клетки промывают два раза, фиксируют 3% параформальдегидом (Electron Microscopy Sciences) в течение 20 минут при комнатной температуре, гасят 50 мМ NH₄Cl (Sigma),

обеспечивают их проницаемость с помощью 0,4% сапонин/2% FBS/1% BSA в течение

25 20 минут, а затем инкубируют с 1 мкг/мл антитела против антител мыши Cy3 (Jackson Immunoresearch) в течение 20 минут. Затем реакцию блокируют в течение 20 минут посредством IgG мыши (Molecular Probes), с последующей инкубацией в течение 30 минут с усилителем сигнала Image-iT FX Signal Enhancer (Molecular Probes). В конце клетки инкубируют с меченным Zenon Alexa488 антителом мыши против LAMP1 (BD

30 Pharmingen), маркером как для лизосом, так и для МПС (лизосома-подобного компартмента, который является частью каскада МНС класса II), в течение 20 минут, а затем фиксируют 3% PFA. Клетки ресуспендируют в 20 мкл буфера с сапонином и позволяют прикрепиться к предметным стеклам, покрытым поли-лизином (Sigma) перед помещением покровного стекла с содержащим DAPI VectaShield (Vector

35 Laboratories). Для иммунофлуоресценции МПС или лизосом, клетки фиксируют, обеспечивают их проницаемость и усиливают, как описано выше, а затем окрашивают совместно меченным Zenon Alexa555-HLA-DM (BD Pharmingen) и Alexa488-Lamp1 в присутствии избытка IgG мыши в соответствии с инструкциями изготовителя (Molecular Probes).

40 Таким образом, колокализация "гуманизированных" антител с пересаженной последовательностью 2F2 или вариантов антител с МПС или лизосомами В-клеточных линий, как оценивают по иммунофлуоресценции, может указывать на то, что молекулы являются превосходными средствами для лечения опухолей у млекопитающих, включая

45 ассоциированные с В-клетками злокачественные опухоли, такие как лимфомы (т.е. неходжкинская лимфома), лейкозы (т.е. хронический лимфоцитарный лейкоз), и другие злокачественные опухоли кроветворных клеток.

ПРИМЕР 5: Получение антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина

Получение антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина проводили, как описано в настоящем документе.

ДНК, кодирующую антитело ch2F2 (легкая цепь, SEQ ID NO:4, фигура 4; и тяжелая цепь, SEQ ID NO:5, фигура 5), можно подвергать мутагенезу способами модификации легкой цепи и тяжелой цепи, описанными в настоящем документе.

ДНК, кодирующую антитело hu2F2.D7 (тяжелая цепь (SEQ ID NO:90) и легкая цепь (SEQ ID NO:89), фигура 13) подвергали мутагенезу способами модификации тяжелой цепи, описанными в настоящем документе. ДНК, кодирующую антитело hu2F2.D7 (тяжелая цепь, (SEQ ID NO:90), фигура 13), также можно подвергать мутагенезу способами модификации Fc-области тяжелой цепи, описанными в настоящем документе.

При получении антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина, ДНК, кодирующую легкую цепь, подвергали мутагенезу для замены цистеином валина в положении 205 по Кабат в легкой цепи (положение по последовательности 210), как показано на фигуре 18 (легкая цепь SEQ ID NO:88 hu2F2.D7 тию-MAb). ДНК, кодирующую тяжелую цепь, подвергали мутагенезу для замены цистеином аланина в положении 118 по EU в тяжелой цепи (положение по последовательности 118; номер по Кабат 114), как показано на фигуре 17 (тяжелая цепь SEQ ID NO:85 hu2F2.D7 тию-MAb). Fc-область антител против CD79b можно подвергать мутагенезу для замены цистеином серина в положении 400 по EU в Fc-области тяжелой цепи (положение по последовательности 400; номер по Кабат 396), как показано в таблице 2-3.

А. Получение антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина для конъюгации путем восстановления и повторного окисления

Полноразмерные моноклональные антитела против CD79b со встроенными в них остатками цистеина (тио-MAb) эспрессировали в клетках CHO и очищали аффинной хроматографией с белком А, с последующей эксклюзионной хроматографией.

Очищенные антитела разбавляют в 500 мМ борате натрия и 500 мМ хлориде натрия при приблизительно pH 8,0 и восстанавливают приблизительно 50-100-кратным молярным избытком 1 мМ ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) в течение приблизительно 1-2 ч при 37°C. Восстановленное тию-MAb разбавляют и помещают в колонку HiTrap S в 10 мМ ацетате натрия, pH 5, и элюируют посредством PBS, содержащего 0,3 М хлорид натрия. Элюированное восстановленное тию-MAb обрабатывают 2 мМ дегидроаскорбиновой кислотой (dhAA) при pH 7 в течение 3 часов, или 2 мМ водным сульфатом меди (CuSO₄) при комнатной температуре в течение ночи.

Также может быть эффективным окисление окружающим воздухом. Буфер заменяют элюированием через смолу Sephadex G25 и элюируют посредством PBS с 1 мМ DTPA. Значение тиол/Ab оценивают путем определения концентрации восстановленного антитела из значения поглощения при 280 нм в растворе и концентрации тиола в реакции с DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) и определения поглощения при 412 нм.

ПРИМЕР 6: Получение конъюгатов антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства путем конъюгации антител против CD79b со встроенными в них остатками цистеина и промежуточных соединений лекарственное средство-линкер

После процессов восстановления и повторного окисления примера 5, антитело против CD79b со встроенными в него остатками цистеина разбавляют в PBS (фосфатно-солевом буфере) и охлаждают на льду. Приблизительно 1,5 молярных эквивалентов промежуточного соединения лекарственное средство ауристатин-линкер, такого как MC-MMAE (малеимидокапроил-монометилауристатин E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-

ММАЕ, или MC-val-cit-PAB-MMAF, с реактивной к тиольной группе функциональной группой, такой как малеимидо, относительно встроенных остатков цистеина на антителе, растворяют в DMSO, разбавляют в ацетонитриле и воде, и добавляют к охлажденному восстановленному, повторно окисленному антителу в PBS. Приблизительно через один час добавляют избыток малеимида для гашения реакции и закрытия любых не вступивших в реакцию тиольных групп антитела. Реакционную смесь концентрируют ультрафильтрацией центрифугированием и конъюгат антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства очищают и обессоливают элюированием через смолу G25 в PBS, фильтруют через 0,2-мкм фильтры в стерильных условиях, и замораживают для хранения.

Получение hu2F2.D7-NC(A118C) тио-MAb-BMPEO-DM1 можно проводить следующим образом. Свободный цистеин на тио-MAb hu2F2.D7-NC(A118C) модифицируют бис-малеимидореагентом BM(PEO)3 (Pierce Chemical), оставляя не вступившую в реакцию малеимидогруппу на поверхности антитела. Это осуществляют растворением BM(PEO)3 в смеси 50% этанол/вода до концентрации 10 мМ и добавлением десятикратного молярного избытка BM(PEO)3 к раствору, содержащему тио-MAb hu2F2.D7-NC(A118C) в фосфатно-солевом буфере в концентрации приблизительно 1,6 мг/мл (10 микромоляр) и позволяя ему реагировать в течение 1 часа. Избыток BM(PEO)3 удаляют гелевой фильтрацией (колонка HiTrap, Pharmacia) в 30 мМ цитратном буфере, pH 6 с 150 мМ NaCl. К промежуточному соединению тио-MAb-BMPEO hu2F2.D7-NC(A118C) добавляют приблизительно 10-кратный молярный избыток DM1, растворенного в диметилацетамиде (DMA). Диметилформамид (DMF) также можно использовать для растворения реагента группы лекарственного средства. Реакционной смеси позволяют реагировать в течение ночи перед гелевой фильтрацией или диализом в PBS для удаления не вступившего в реакцию лекарственного средства. Гелевую фильтрацию на колонках S200 в PBS используют для удаления высокомолекулярных агрегатов и предоставления очищенного тио-MAb-BMPEO-DM1 hu2F2.D7-NC(A118C).

С помощью тех же протоколов, можно получать тио-контрольное hu-anti-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-контрольное hu-anti-HER2-NC(A118C)-MC-MMAF, тио-контрольное hu-anti-HER2-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE и тио-контрольное антитело против CD22-NC(A118C)-MC-MMAF.

С помощью описанного выше способа, можно получать и тестировать конъюгаты антитела против CD79b со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства (TDC), например, но не ограничиваясь ими, следующие:

1. thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-MC-MMAF посредством конъюгации A118C thio-hu2F2.D7-NC(A118C) и MC-MMAF;
2. thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-BMPEO-DM1 посредством конъюгации A118C thio-hu2F2.D7-NC(A118C) и BMPEO-DM1;
3. thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE посредством конъюгации A118C thio-hu2F2.D7-NC(A118C) и MC-val-cit-PAB-MMAE;
4. thio-ch2F2-NC(A118C)-MC-MMAF посредством конъюгации thio-ch2F2-NC(A118C) и MC-MMAF; и
5. thio-ch2F2-LC(V205C)-MC-MMAF посредством конъюгации thio-ch2F2-LC(V205C) и MC-MMAF.

ПРИМЕР 7: Охарактеризация аффинности связывания конъюгатов тио-MAb со встроенными в него остатками цистеина и лекарственного средства с антигеном клеточной поверхности

Аффинность связывания конъюгатов thio-hu2F2.D7-лекарственное средство и

конъюгатов thio-ch2F2-лекарственное средство с CD79b, экспрессированным на клетках BJAB-люцифераза, определяют посредством анализа FACS.

В кратком изложении, приблизительно 1×10^6 клеток в 100 мкл контактируют с различными количествами (1,0 мкг, 0,1 мкг или 0,01 мкг Ab на миллион клеток BJAB-люцифераза) одного из, но не ограничиваясь ими, следующих конъюгатов тио-MAb против CD79b и лекарственного средства или “голого” антитела (неконъюгированное Ab в качестве контроля): (1) thio-ch2F2-LC(V205C)-MC-MMAF или (2) thio-ch2F2-NC(A118C)-MC-MMAF; (3) thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (4) thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-BMPEO-DM1, или (5) thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-MC-MMAF. В качестве вторичного антитела для детекции используют конъюгированное с PE антитело мыши против Ig человека (BD каталожный# 555787).

Детекцию антитела против CD79b, связанного с клеточной поверхностью, проводят с использованием конъюгированного с PE антитела мыши против Ig человека.

ПРИМЕР 8: Анализ снижения пролиферации клеток *in vitro* посредством конъюгатов тио-MAb против CD79b и лекарственного средства

Эффективность *in vitro* конъюгатов тио-MAb против CD79b-лекарственное средство (включая, но не ограничиваясь ими thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-MCMMAF, thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE и thio-hu2F2.D7-NC(A118C)-BMPEO-DM1), измеряют посредством анализа клеточной пролиферации (например, в клетках BJAB-люцифераза, Granta-519, WSU-DLCL2). Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® является коммерчески доступным (Promega Corp., Madison, WI), гомогенным способом анализа на основе рекомбинантной экспрессии люциферазы Coleoptera (US 5583024; US 5674713; US 5700670). В этом анализе клеточной пролиферации определяют количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТР, показателя метаболически активных клеток (Crouch et al., J Immunol Metho., 160: 81-88 (1993); US 6602677). Анализ CellTiter-Glo® проводят в 96-луночном формате, что делает его подходящим для автоматизированного высокопроизводительного скрининга (HTS) (Cree et al., Anticancer Drugs, 6:398-404 (1995)). Способ гомогенного анализа вовлекает добавление одного реагента (реагента CellTiter-Glo®) прямо к клеткам, культивированным в дополненной сывороткой среде.

Единообразный формат "добавление-смешивание-измерение" обеспечивает лизис клеток и образование люминесцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующего АТР. Субстрат, люциферин жуков, окислительно декарбоксилируется рекомбинантной люциферазой светляка с одновременным превращением АТР в АМР и образованием фотонов. Жизнеспособные клетки выражают в качестве относительных единиц люминесценции (RLU). Данные можно регистрировать с помощью люминометра или визуализирующим устройством с камерой CCD. Выход люминесценции выражают в качестве относительных световых единиц (RLU). %RLU представляет собой нормализованный процент RLU по сравнению с контролем в виде "не конъюгата с лекарственным средством". Альтернативно фотоны от люминесценции можно подсчитывать в сцинтилляционном счетчике в присутствии сцинтиллятора. Световые единицы могут быть выражены как CPS (количество импульсов в секунду).

Эффективность конъюгатов тио-MAb-лекарственное средство измеряют посредством анализа клеточной пролиферации с использованием следующего протокола, адаптированного из люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter Glo, Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)):

1. Аликвоту 40 мкл клеточной культуры, содержащей приблизительно 3000 клеток BJAB, Granta-519 или WSU-DLCL2 в среде наносят в каждую лунку 384-луночного

непрозрачного планшета.

2. В экспериментальные лунки в четырех экземплярах добавляют TDC (конъюгат тио-Mab-лекарственное средство) (10 мкл) до конечной концентрации 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13,7, 4,6 или 1,5 нг/мл, с контрольными лунками с "не конъюгатом лекарственного средства", в которые добавляли среду отдельно, и инкубируют в течение 3 суток.

3. Осадок уравнивают до комнатной температуры в течение приблизительно 30 минут.

4. Добавляют реагент CellTiter-Glo (50 мкл).

5. Содержимое смешивают в течение 2 минут на орбитальном устройстве для встряхивания для индукции лизиса клеток.

6. Планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала.

7. Люминесценцию регистрируют и представляют в графиках в качестве %RLU (относительных единиц люминесценции). Данные от клеток, инкубированных со средой, не содержащей конъюгат лекарственного средства, наносят на график в концентрации 0,51 нг/мл.

Среда: клетки BJAB, Granta-519 и WSU-DLCL2, выращенные в RPMI1640/10%FBS/2 мМ глутамине.

ПРИМЕР 9: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* посредством конъюгатов тио-Mab против CD79b и лекарственного средства

В сходном исследовании с использованием протокола исследования с ксенотрансплантатом, описанного в примере 3 (см. выше), варьируя конъюгаты лекарственного средства и дозы, исследуют эффективность конъюгатов тио-MAb и лекарственного средства в отношении снижения объема В-клеточной опухоли в моделях с ксенотрансплантатами, например, ксенотрансплантатами Granta-519 (лимфома из клеток мантийной зоны человека), ксенотрансплантатами DOHH2 (фолликулярная лимфома), ксенотрансплантатами WSU-DLCL2 (диффузная крупноклеточная лимфома) или ксенотрансплантатами BJAB (лимфома Беркитта).

Считается, что представленное выше письменное описание позволяет специалисту в данной области применять изобретение на практике. Настоящее изобретение не ограничивается по объему депонированной конструкцией, поскольку депонированный вариант осуществления предполагается как одна иллюстрация определенных аспектов изобретения, и любые конструкции, которые являются функционально эквивалентными, относятся к объему этого изобретения. Депонированный материал, описанный в настоящем документе, не следует истолковывать как допущение того, что письменное описание, содержащееся в настоящем документе, является недостаточным для того, чтобы позволить применять на практике любой из аспектов изобретения, включая наилучший способ его осуществления, а также его не следует истолковывать, как ограничивающий объем формулы изобретения конкретными иллюстрациями, которые в нем представлены. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к модификациям, показанным и описанным в настоящем документе, станут очевидными специалистам в данной области из указанного выше описания, и относятся к объему прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Гуманизированное антитело против CD79b или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее следующие гипервариабельные области (HVR):

(i) HVR-L1, содержащую последовательность A1-A16, где A1-A16 представляет собой KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:23);

(ii) HVR-L2, содержащую последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой LVSKLDS (SEQ ID NO:24);

5 (iii) HVR-L3, содержащую последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой FQGTHTFPFT (SEQ ID NO:25);

(iv) HVR-H1, содержащую последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:31);

10 (v) HVR-H2, содержащую последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO:32); и

(vi) HVR-H3, содержащую последовательность F1-F6, где F1-F6 представляет собой ARNLYL (SEQ ID NO:33).

2. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, где по меньшей мере часть последовательности каркасной области представляет собой консенсусную
15 последовательность каркасной области человека.

3. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, которое связывает тот же эпитоп, что и моноклональное антитело, содержащее переменные домены SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:14,

20 где эпитоп соответствует аминокислотам 1-11 последовательности SEQ ID NO:78, как определено анализом Biacore.

4. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, которое связывает тот же эпитоп, что и

(i) фрагмент Fab моноклонального антитела, продуцируемый гибридомой с номером доступа ATCC PTA-7712; и/или

25 (ii) химерное антитело, содержащее переменные домены антитела, продуцированного гибридомой с номером доступа ATCC PTA-7712,

где эпитоп соответствует аминокислотам 1-11 последовательности SEQ ID NO:78, как определено анализом Biacore.

5. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, где одновалентная
30 аффинность антитела против CD79b человека является

(a) по существу такой же, как и одновалентная аффинность антитела мыши, содержащего последовательность переменной последовательности легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8A-B (SEQ ID NO:14);

35 (b) по меньшей мере в 1, 2 или 3 раза больше, чем одновалентная аффинность антитела мыши или химерного антитела, содержащего переменную последовательность легкой цепи и тяжелой цепи, как указано на фиг. 7 (SEQ ID NO:10) и на фиг. 8A-B (SEQ ID NO:14); или

40 (c) по меньшей мере в 1, 2 или 3 раза меньше, чем одновалентная аффинность антитела мыши или химерного антитела, содержащего переменную последовательность легкой цепи и тяжелой цепи, как указано на фиг. 7 (SEQ ID NO:10) и на фиг. 8A-B (SEQ ID NO:14);

где антитело против CD79b связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, содержащее переменные домены SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:14,

45 где эпитоп соответствует аминокислотам 1-11 последовательности SEQ ID NO:78, как определено анализом Biacore.

6. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, где аффинность антитела в его двухвалентной форме против CD79b человека является

(а) по существу такой же, как и аффинность антитела мыши в его двухвалентной форме, и содержащее последовательность вариабельной области легкой цепи и тяжелой цепи, как представлено на фигуре 7 (SEQ ID NO:10) и фигурах 8А-В (SEQ ID NO:14);

(b) по меньшей мере в 1, 2 или 3 раза больше, чем аффинность антитела мыши или химерного антитела в его бивалентной форме и содержащего вариабельную последовательность легкой цепи и тяжелой цепи, как указано на фиг. 7 (SEQ ID NO:10) и на фиг. 8А-В (SEQ ID NO:14);

(с) 2,0 нМ +/- 0,53; или

(d) больше чем 1,5 нМ;

где антитело против CD79b связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, содержащее вариабельные домены SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:14,

где эпитоп соответствует аминокислотам 1-11 последовательности SEQ ID NO:78, как определено анализом Biacore.

7. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1, 5 и 6, где гуманизированное антитело, если оно конъюгировано с цитотоксическим средством, ингибирует рост клеток опухоли.

8. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1, 5 и 6, содержащее единичную область Fab, связанную с областью Fc.

9. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.5 или 6, где антитело мыши продуцируется гибридомной клеточной линией, депонированной в АТСС под номером РТА-7712.

10. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.5 или 6, где связывающая аффинность выражена как значение Kd.

11. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.5 или 6, где связывающую аффинность измеряют Biacore, ELISA или радиоиммунным анализом.

12. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, содержащее последовательность консенсусной каркасной области к подгруппы 1 человека.

13. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, содержащее последовательность консенсусной каркасной области подгруппы III тяжелой цепи человека.

14. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.13, где последовательность каркасной области содержит замену в положении 71, 73 и/или 78.

15. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.14, где указанная замена представляет собой R71A, N73T и/или L78A.

16. Гуманизированное антитело против CD79b или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее

(а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и HVR3-НС, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:31-33);

(b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и HVR3-LC, представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:23-25).

17. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.16, где вариабельная область содержит последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, изображенную на фиг. 13 (SEQ ID NO:27-30).

18. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.16 и 17, где антитело содержит последовательность СН1 и/или Fc, представленную в (SEQ ID NO:34 и/или 35).

19. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.16, где вариабельный домен содержит последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC,

представленную на фигуре 13 (SEQ ID NO:19-22).

20. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое связывается с CD79b, где антитело содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16, и вариабельный домен легкой цепи, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; или

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, и вариабельный домен легкой цепи, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10,

где антитело связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, содержащее вариабельные домены SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:14, и/или фрагмент Fab моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой с номером доступа ATCC PTA-7712, и/или химерное антитело, содержащее вариабельные домены антитела, продуцируемого гибридомой с номером доступа ATCC PTA-7712,

где эпитоп соответствует аминокислотам 1-11 последовательности SEQ ID NO:78, как определено анализом Biacore.

21. Способ получения антитела против CD79b, где способ включает (a) культивирование клетки-хозяина, выбранной из группы, содержащей эукариотическую клетку и клетку СНО, в условиях, подходящих для экспрессии полинуклеотида, кодирующего антитело по любому из пп.1-2, 16-20, и (b) выделение антитела.

22. Антитело против CD79b или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью, представленной на фиг.13 (SEQ ID NO:16), и вариабельную область легкой цепи с последовательностью, представленной на фиг.13 (SEQ ID NO:12).

23. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.22, где антитело является моновалентным и содержит область Fc.

24. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1 или 16, где антитело содержит

(a) вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и/или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16,

где антитело связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, содержащее вариабельные области SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:14, и/или фрагмент Fab моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой с номером доступа ATCC PTA-7712, и/или химерное антитело, содержащее вариабельные области антитела, продуцируемого гибридомой с номером доступа ATCC PTA-7712,

где эпитоп соответствует аминокислотам 1-11 последовательности SEQ ID NO:78, как определено анализом Biacore.

25. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1 или 16, где антитело содержит

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую одну, две, три или четыре аминокислотных последовательностей каркасных областей, выбранных из SEQ ID NO: 69, 70, 71 и 72; и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую одну, две, три или четыре аминокислотных последовательностей каркасных областей, выбранных из SEQ ID NO:

65, 66, 67 и 68.

26. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1 или 16, где антитело содержит

(а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую одну, две, три или четыре аминокислотных последовательностей каркасных областей, выбранных из SEQ ID NO: 69, 70, 71 и 72; и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую одну, две, три или четыре аминокислотных последовательности каркасных областей, которые по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:65, 66, 67 и 68,

где антитело связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, содержащее вариабельные области SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO:14, и/или фрагмент Fab моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой с номером доступа ATCC РТА-7712, и/или химерное антитело, содержащее вариабельные области антитела, продуцируемого гибридомой с номером доступа ATCC РТА-7712,

где эпитоп соответствует аминокислотам 1-11 последовательности SEQ ID NO:78, как определено анализом Biacore.

27. Иммуноконъюгат для ингибирования В-клеточной пролиферации, содержащий антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20, ковалентно присоединенное к цитотоксическому средству или к средству для ингибирования роста клеток.

28. Иммуноконъюгат по п.27, где цитотоксическое средство выбрано из токсина, химиотерапевтического средства, лекарственной молекулы, антибиотика, радиоактивного изотопа и нуклеолитического фермента.

29. Иммуноконъюгат по п.28, где иммуноконъюгат имеет формулу I



где:

(a) Ab представляет собой антитело по любому из пп.1-2, 20 или 23;

(b) L представляет собой линкер;

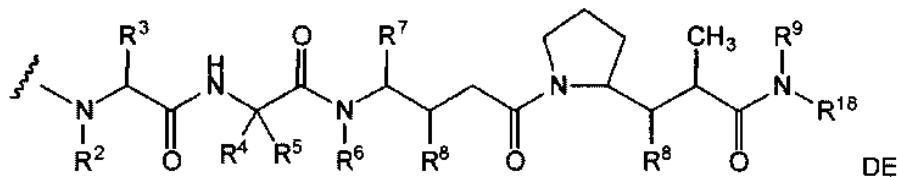
(c) D представляет собой лекарственную молекулу,

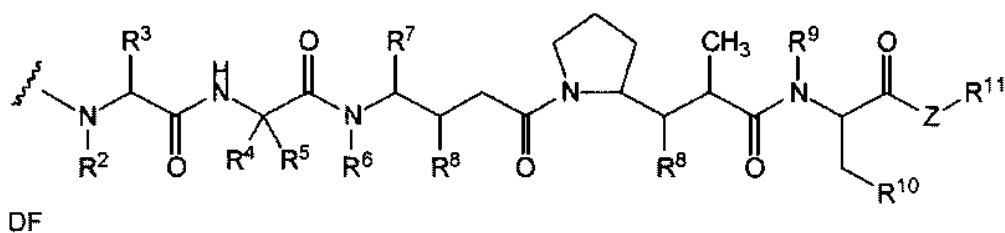
где p равно от около 1 до около 8.

30. Иммуноконъюгат по п.29, где L выбран из 6-малеимидокапроила (MC), малеимидопропаноила (MP), валин-цитруллина (val-cit), аланина-фенилаланина (ala-phe), п-аминобензилоксикарбонила (PAB), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноата (SPP), N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1 карбоксилата (SMCC) и N-сукцинимидил (4-йодо-ацетил)аминобензоата (SIAB).

31. Иммуноконъюгат по п.29, где D выбран из группы, состоящей из майтанзиноида, ауристатина и долостатина.

32. Иммуноконъюгат по п.31, где D представляет собой ауристатин или долостатин, и где D представляет собой лекарственную молекулу формулы DE или DF:





и где каждый R^2 и R^6 является метилом, каждый R^3 и R^4 представляет собой
 10 изопропил, R^5 представляет собой -H, R^7 представляет собой втор-бутил, каждый R^8
 независимо выбран из CH_3 , $O-CH_3$, OH и H ; R^9 представляет собой H ; R^{10} представляет
 собой арил; Z представляет собой -O- или -NH-; R^{11} представляет собой H , C_1-C_8 алкил
 или $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_3$; и R^{18} представляет собой $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арил; и

15 (d) значение p составляет от около 1 до 6,

где лекарственная молекула выбрана из MMAE и MMAF.

33. Иммуноконъюгат по п.29, который имеет формулу $Ab-(L-MMAE)_p$, где L
 представляет собой линкер, а значение p составляет от 2 до 5.

34. Иммуноконъюгат по п.29, который имеет формулу $Ab-(L-MMAF)_p$, где L
 20 представляет собой линкер, а значение p составляет от 2 до 5.

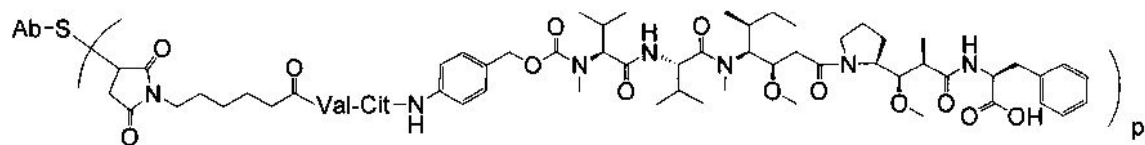
35. Иммуноконъюгат по п.33 или 34, где L содержит val-cit, MC, PAB или MC-PAB.

36. Иммуноконъюгат по п.29, где D представляет собой майтанзиноид.

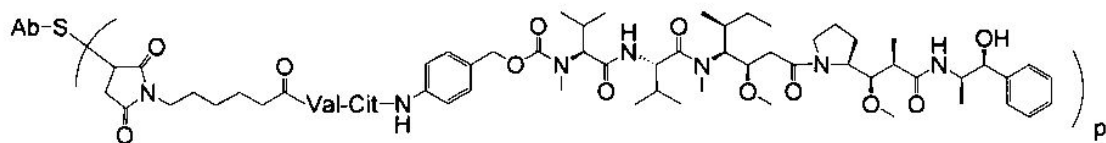
37. Иммуноконъюгат по п.36, где D выбран из DM1, DM3 и DM4.

38. Иммуноконъюгат по п.36, где значение p составляет 2-4 или 3-4.

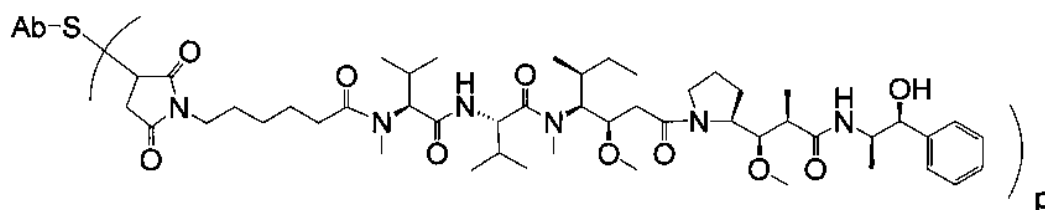
39. Иммуноконъюгат по п.29, где иммуноконъюгат выбран из структур:



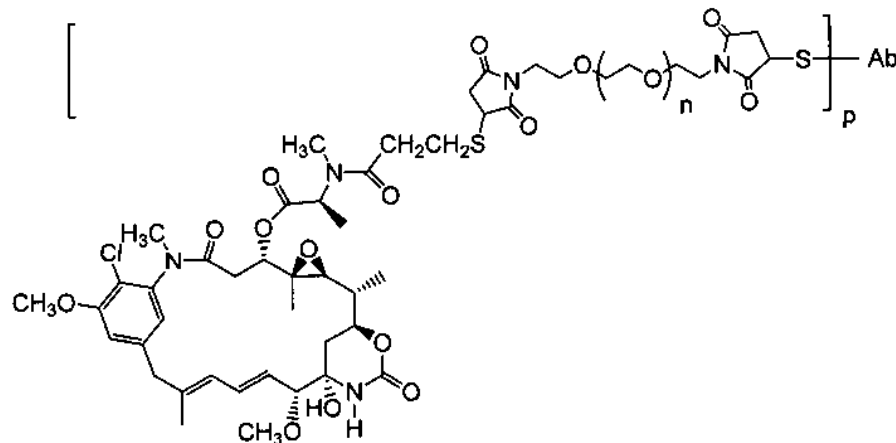
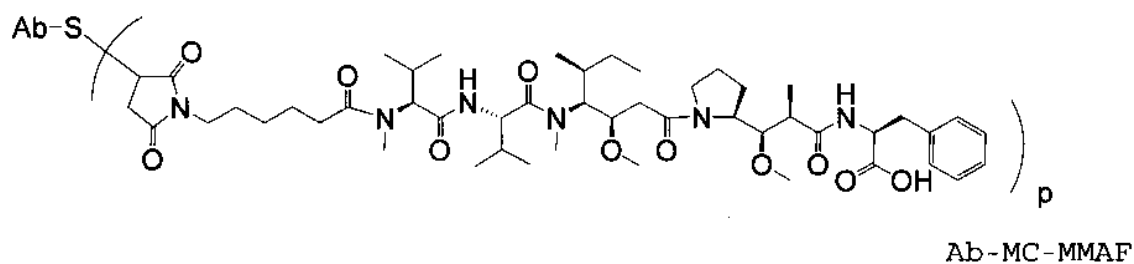
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-BMPEO-DM1,

где Val представляет собой валин, а Cit представляет собой цитруллин.

40. Фармацевтическая композиция для ингибирования В-клеточной пролиферации, содержащая эффективное количество иммуноконъюгата по п.29 и фармацевтически приемлемый носитель.

41. Антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгат по п. 27 для применения для ингибирования роста клеток, которые экспрессируют CD79b.

42. Антитело или иммуноконъюгат по п.41, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

43. Антитело или иммуноконъюгат по п.41, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

44. Применение антитела по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгата по п.27 для получения лекарственного средства для ингибирования роста клеток, которые экспрессируют CD79b.

45. Применение по п.44, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

46. Применение по п.44, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

47. Антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгат по п. 27 для применения в эффективном количестве для лечения индивидуума, страдающего раком.

48. Антитело или иммуноконъюгат по п.47, где злокачественная опухоль выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

49. Антитело или иммуноконъюгат по п.47, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

50. Антитело или иммуноконъюгат по п.47, где указанное антитело конъюгировано

с ингибирующим рост средством.

51. Применение антитела по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгата по п.27 для получения лекарственного средства для лечения индивидуума, страдающего раком.

52. Применение по п.51, где злокачественная опухоль выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

53. Применение по п.51, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

54. Применение по п.51, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

55. Антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 для применения в эффективном количестве для лечения пролиферативного заболевания у индивида.

56. Антитело по п.55, где указанным пролиферативным заболеванием является злокачественная опухоль.

57. Антитело по п.55, где указанная злокачественная опухоль выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

58. Антитело по п.55, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

59. Антитело по п.55, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

60. Применение антитела по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания у индивида.

61. Применение по п.60, где указанным пролиферативным заболеванием является злокачественная опухоль.

62. Применение по п.60, где указанная злокачественная опухоль выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

63. Применение по п.60, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

64. Применение по п.60, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

65. Антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгат по п.27 для применения в эффективном количестве для ингибирования роста клеток, где рост указанных клеток по меньшей мере частично зависит от потенцирующего клеточный рост эффекта CD79b.

66. Антитело или иммуноконъюгат по п.65, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

67. Антитело или иммуноконъюгат по п.65, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

68. Применение антитела по любому из пп.16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгата по п.27 для получения лекарственного средства для ингибирования роста клеток, где рост указанных клеток по меньшей мере частично зависит от потенцирующего клеточный рост эффекта CD79b.

69. Применение по п.68, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

70. Применение по п.68, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

71. Антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгат по п.27 для применения в эффективном количестве для терапевтического лечения опухоли у млекопитающего, где рост указанной опухоли по меньшей мере частично зависит от потенцирующего рост эффекта CD79b.

72. Антитело или иммуноконъюгат по п.71, где указанная опухоль выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

73. Антитело или иммуноконъюгат по п.71, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

74. Антитело или иммуноконъюгат по п.71, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

75. Применение антитела по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 или иммуноконъюгата по п.27 для получения лекарственного средства для лечения опухоли у млекопитающего, где рост указанной опухоли по меньшей мере частично зависит от потенцирующего рост эффекта CD79b.

76. Применение по п.75, где указанная опухоль выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

77. Применение по п.75, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

78. Применение по п.75, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

79. Иммуноконъюгат по п.28 для применения для ингибирования В-клеточной пролиферации путем воздействия на клетку иммуноконъюгатом в условиях, при которых возможно связывание иммуноконъюгата с CD79b.

80. Иммуноконъюгат по п.79, где В-клеточная пролиферация выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

81. Иммуноконъюгат по п.79, где В-клетка является ксенотрансплантатом.

82. Иммуноконъюгат по п.79, где воздействие проводят *in vitro*.

83. Иммуноконъюгат по п.79, где воздействие проводят *in vivo*.

84. Применение иммуноконъюгата по п.28 для получения лекарственного средства для ингибирования В-клеточной пролиферации, где при введении лекарственное средство вводят в клетки для воздействия на клетку иммуноконъюгатом в условиях, при которых возможно связывание иммуноконъюгата с CD79b.

85. Применение иммуноконъюгата по п.28 для получения лекарственного средства для ингибирования В-клеточной пролиферации, где лекарственное средство вводят в состав для введения в клетку для воздействия на клетку иммуноконъюгатом в условиях, при которых возможно связывание иммуноконъюгата с CD79b.

86. Применение по пп.84 и 85, где В-клеточная пролиферация выбрана из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

87. Применение по пп.84 и 85, где В-клетка является ксенотрансплантатом.

88. Применение по пп.84 и 85, где воздействие проводят *in vitro*.

89. Применение по пп.84 и 85, где воздействие проводят *in vivo*.

90. Способ определения наличия CD79b в образце, предположительно содержащем CD79b, причем указанный способ включает воздействие на указанный образец антитела по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20, и определение связывания указанного антитела с CD79b в указанном образце, где связывание указанного антитела с CD79b в указанном образце указывает на наличие указанного белка в указанном образце.

91. Способ по п.90, где биологический образец взят у пациента, предположительно имеющего В-клеточно-пролиферативное заболевание.

92. Способ по п.91, где В-клеточно-пролиферативное нарушение выбрано из лимфомы, неходжкинской лимфомы (NHL), агрессивной NHL, рецидивирующей агрессивной NHL, рецидивирующей вялотекущей NHL, рефрактерной NHL, рефрактерной вялотекущей NHL, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелколимфоцитарной лимфомы, лейкоза, волосатоклеточного лейкоза (HCL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

93. Антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20 и иммуноконъюгат по п.27 для применения для связывания клетки, которая экспрессирует CD79b.

94. Способ по п.93, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

95. Способ по п.93, где указанное антитело конъюгировано с ингибирующим рост средством.

96. Способ получения антитела против CD79b, где способ включает (а) культивирование клетки-хозяина, выбранной из группы, содержащей эукариотическую клетку и клетку СНО, в условиях, подходящих для экспрессии полинуклеотида, кодирующего антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20, и (b) выделение антитела, где эукариотическая клетка не является клеткой человека.

97. Композиция для ингибирования В-клеточной пролиферации, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп.1, 16-20.

98. Композиция по п.97, где композиция содержит носитель.

99. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1, 16, 17, 19 и 20.

100. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.99.

101. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.100 для получения антитела по пп.1, 16, 17, 19 и 20.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD79В И ИММУНОКОНЬЮГАТЫ
И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> P5112R1 WO

<141> 2007-10-19

<150> US 60/950,088

<151> 2007-07-16

<160> 122

<210> 1

<211> 1270

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50
tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100
aggctggcgt tgtctcctgt gccagccac tggatggtgg cgttgctgct 150
gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccggtagc 200
ggaatcccaa aggtagtgtt tggtcggga tctggcagag cccacgtttc 250
atagccagga aacggggcctt cacggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300
cgctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350
cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaagagtc ccagaacgaa 400
tctctcgcca ccctcaccat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450
ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcgagggtc taccagggct 500
goggcacaga gctgogagtc atgggattca gcacctggc acagctgaag 550
cagaggaaca cgctgaagga tggatcatc atgatccaga cgctgctgat 600
catctcttc atcatcgtgc ctatcttcct gctgctggac aaggatgaca 650
gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgagggcct ggacattgac 700
cagacagcca cctatgagga catagtgcg ctgcggacag gggaagtga 750
gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800
tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850
gctcatggcc caacccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900
gccaccaga gctgccattt gtctccagcc cctgggtccc agctcttgcc 950
aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttgg agggagttct 1000
ctggggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050

```

ccccacacat gggatggggg aggcagagac tgggtccagag cccgcaaagt 1100
gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150
aactgggccc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200
tcccccccca gggaggccct ggccctccagt gccttcccccc gtggaataaa 1250
cggtgtgtcc tgagaaacca 1270

<210> 2

<211> 229

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 657
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Химерное антитело 2F2 - Легкая цепь

<400> 3
 gatatcgtga tgacccagac tccactcaat ttgtcgggta ccattggaca 50
 accagcctcc atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100
 gaaagacata tttgaattgg ttattacaga ggccaggcca gtctccagag 150
 cgcctaattt atctgggtgc taaactggat tctggagtcc ctgacagggt 200
 cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250
 aggctgagga tttgggagtt tattgttgct ggcaaggtag acattttccg 300
 tacacgttcg gagggggtag caaggtagag atcaaacgaa ctgtggctgc 350
 accatctgtc ttcattcttc cgcattctga tgagcagttg aaatctggaa 400
 ctgcttctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 450
 gtacagtggg aggtggataa cgcctccaa tcgggtaact cccaggagag 500
 tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc 550
 tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg 650
 agagtgt 657

<210> 4
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Химерное антитело 2F2 - Легкая цепь

<400> 4
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
 1 5 10 15
 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
 35 40 45
 Gly Gln Ser Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90

Tyr	Cys	Cys	Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	95	100	105
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	110	115	120
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	125	130	135
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	140	145	150
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	155	160	165
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	170	175	180
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	185	190	195
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	200	205	210
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							215		

<210> 5

<211> 1329

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерное антитело 2F2 - Тяжелая цепь

<400> 5

```

cagggttcaac tccagcaacc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc 50
agtgaagctg tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga 100
tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgaatg gattggtatg 150
attgatcctt cagacagtga aactcactac aatcatatct tcaaggacaa 200
ggccactttg actgtagaca aatcctccag cacagcctac ttgcagctca 250
gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaaatctc 300
tacttgtggg gtcaaggaac ctcaagcacc gtctccttag cctccaccaa 350
gggcccacgc gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 400
gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 450
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc 500
ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgactg 550
tgccctctag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 600
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga 650
caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac 700

```

cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 750
 cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc 800
 tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca 850
 agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 900
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg 950
 caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 1000
 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1050
 cggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg 1100
 cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg 1150
 agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa 1250
 cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc 1300
 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 1329

<210> 6

<211> 442

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерное антитело 2F2 - Тяжелая цепь

<400> 6

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
				20					25					30	
Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Met	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	
				50					55					60	
Asn	His	Ile	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	
				80					85					90	
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Tyr	Leu	Trp	Gly	Gln	
				95					100					105	
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
				110					115					120	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
				125					130					135	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
				140					145					150	

RU 2 557 319 C2

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	155	160	165
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	170	175	180
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	185	190	195
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	200	205	210
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	215	220	225
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	230	235	240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	245	250	255
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	260	265	270
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	290	295	300
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	305	310	315
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	320	325	330
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	335	340	345
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	350	355	360
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	365	370	375
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	380	385	390
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	395	400	405
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	410	415	420
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	425	430	435
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly									440		

<210> 7
 <211> 231
 <212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8

<211> 228

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 8

Met	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Ser	Ser	Met	Pro	Cys	His	Trp	Leu	Leu	1	5	10	15
Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Gly	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Met	Thr	20	25	30	

Ser Ser Asp Leu Pro Leu Asn Phe Gln Gly Ser Pro Cys Ser Gln
35 40 45

Ile Trp Gln His Pro Arg Phe Ala Ala Lys Lys Arg Ser Ser Met
50 55 60

Val Lys Phe His Cys Tyr Thr Asn His Ser Gly Ala Leu Thr Trp
65 70 75

Phe Arg Lys Arg Gly Ser Gln Gln Pro Gln Glu Leu Val Ser Glu
80 85 90

Glu Gly Arg Ile Val Gln Thr Gln Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu
95 100 105

Thr Ile Gln Asn Ile Gln Tyr Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys
110 115 120

Lys Gln Lys Cys Asp Ser Ala Asn His Asn Val Thr Asp Ser Cys
125 130 135

Gly Thr Glu Leu Leu Val Leu Gly Phe Ser Thr Leu Asp Gln Leu
140 145 150

Lys Arg Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu Ile Gln Thr
155 160 165

Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu
170 175 180

Asp Lys Asp Asp Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr
185 190 195

Glu Gly Leu Asn Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val
200 205 210

Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
215 220 225

Gly Gln Glu

<210> 9

<211> 108

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

<210> 10
<211> 113
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельный домен легкой цепи химерного hu2F2

<400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
35 40 45
Gly Gln Ser Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90
Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 11
<211> 113
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельный домен легкой цепи гуманизированного антитела с
пересаженной последовательностью
(hu2F2 с пересаженной последовательностью)

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 12

<211> 113

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен легкой цепи гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 12

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 13

<211> 113

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

<210> 14
<211> 113
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи химерного 2F2

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60
Asn His Ile Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Leu
110

<210> 15
<211> 113
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного антитела
с пересаженной последовательностью (hu2F2 с пересаженной
последовательностью)

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

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

<210> 16

<211> 113

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 16

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

<210> 17

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR-L3 (неполная) варианта гуманизированного антитела (hu2F2 с пересаженной последовательностью)

<400> 17

Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	
				5				

<210> 18

<211> 8

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела (мутация HVR-L3)

<400> 18
 Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe
 5

<210> 19
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 20
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR2 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 20
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 21
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Cys

<210> 22
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR4 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 22

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 23

<211> 16

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR1 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 23

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Asn

<210> 24

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR2 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 24

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
5

<210> 25

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR3 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 25

Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
5

<210> 26

<211> 106

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CL1 - LC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 26

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

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

Cys

```
<210> 27
<211> 25
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> FR1 - HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

```
<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
  1                               10                      15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                20                      25
```

```
<210> 28
<211> 13
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> FR2 - HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

```
<400> 28
  Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                   5             10
```

<210> 29
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR3 - HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

```
<400> 29
  Arg  Phe  Thr  Ile  Ser  Ala  Asp  Thr  Ser  Lys  Asn  Thr  Ala  Tyr  Leu
        1          5          10          15

  Gln  Met  Asn  Ser  Leu  Arg  Ala  Glu  Asp  Thr  Ala  Val  Tyr  Tyr  Cys
                20          25          30
```

```
<210> 30
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
```

<223> FR4 - HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

```
<400> 30
  Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                5                10
```

<210> 31
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR1 - HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 31
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
 5 10

<210> 32
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR2 - HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 32
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn His Ile
 1 5 10 15

Phe Lys Asp

<210> 33
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR3 - HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 33
 Ala Arg Asn Leu Tyr Leu
 5

<210> 34
 <211> 108
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1 HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 34
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 1 5 10 15

 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 20 25 30

 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 35 40 45

 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 50 55 60

 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 65 70 75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
95 100 105

Thr His Thr

<210> 35
<211> 221
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Fc HC варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 35
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
80 85 90

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
95 100 105

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
110 115 120

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
125 130 135

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
140 145 150

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
155 160 165

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
170 175 180

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
185 190 195

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
200 205 210

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
215 220

<210> 36

<211> 87
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
 35 40 45
 Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 50 55 60
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85

<210> 37
 <211> 81
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 38
 <211> 80
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60

Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				65					70					75

Val	Thr	Val	Ser	Ser
				80

<210> 39
 <211> 79
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 87
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 81
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

<210> 42
 <211> 80
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

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

<210> 43
 <211> 79
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

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

<210> 44

<211> 87
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85

<210> 45
 <211> 81
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 46
 <211> 80
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 47
<211> 79
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 47
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 48
<211> 87
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 49
<211> 81
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

RU 2 557 319 C2

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

<210> 50
 <211> 80
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

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

<210> 51
 <211> 87
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

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

<210> 52

<211> 81
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 53
 <211> 80
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 54
 <211> 79
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 55
<211> 80
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 55
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 56
<211> 80
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 56
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15
Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60
Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 57
<211> 80
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 57
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

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

<210> 58
<211> 80
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 58
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 59
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR1-LC hu2F2 с пересаженной последовательностью

<400> 59
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
1 5 10 15
Asn

<210> 60
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR2-LC hu2F2 с пересаженной последовательностью

<400> 60
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

5

<210> 61
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR3-LC hu2F2 с пересаженной последовательностью

<400> 61
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
 5

<210> 62
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR1-NC hu2F2 с пересаженной последовательностью

<400> 62
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
 5 10

<210> 63
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR2-NC hu2F2 с пересаженной последовательностью

<400> 63
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn His Ile
 1 5 10 15
 Phe Lys Asp

<210> 64
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR3-NC 2F2 с пересаженной последовательностью

<400> 64
 Ala Arg Asn Leu Tyr Leu
 5

<210> 65
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 66
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 67
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Cys

<210> 68
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

<210> 69
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 70
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10

<210> 71
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

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

<210> 72
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 73
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Xaa = A или N

<400> 73
 Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
 1 5 10 15

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

<210> 74
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

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

Ala

<210> 75
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 76
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu

1	5	10	15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	20	25	30

Ser

<210> 77
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 77			
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu			
1	5	10	15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	20	25	30

Ser Arg

<210> 78
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Пептид, содержащий эпитоп

<400> 78			
Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys			
1	5	10	15

Lys

<210> 79
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR - L3 варианта гуманизированного антитела (hu2F2.D7)

<400> 79	
Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr	
	5

<210> 80
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Связывающий альбумин пептид

<400> 80			
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu			
1	5	10	15
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe			
	20	25	30

<210> 81
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Связывающий альбумин пептид

 <400> 81
 Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
 1 5 10 15

 Trp Glu Asp Asp Phe
 20

 <210> 82
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Связывающий альбумин пептид

 <400> 82
 Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
 1 5 10 15

 Trp Glu Asp Asp Phe
 20

 <210> 83
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Связывающий альбумин пептид

 <400> 83
 Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

 Glu Asp Asp

 <210> 84
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Связывающий альбумин пептид

 <400> 84
 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 5 10

 <210> 85
 <211> 442
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> Вариант тио-антитела против CD79b (hu2F2.D7)-HC(A118C) - HC

<400> 85

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr		20	25	30	
Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		35	40	45	
Glu	Trp	Val	Gly	Met	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr		50	55	60	
Asn	His	Ile	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser		65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp		80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Tyr	Leu	Trp	Gly	Gln		95	100	105	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser		110	115	120	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr		125	130	135	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val		140	145	150	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		155	160	165	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		170	175	180	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile		185	190	195	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys		200	205	210	
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		215	220	225	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro		230	235	240	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		245	250	255	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys		260	265	270	
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		290	295	300	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr					

				305					310					315
Lys	Cys	Lys	Val	Ser 320	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 325	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys 330
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 335	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 340	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 345
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 350	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 355	Lys	Asn	Gln	Val	Ser 360
Leu	Thr	Cys	Leu	Val 365	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 370	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 375
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 380	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 385	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 390
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 395	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 400	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 405
Leu	Thr	Val	Asp	Lys 410	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 415	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 420
Cys	Ser	Val	Met	His 425	Glu	Ala	Leu	His	Asn 430	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 435
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 440	Pro	Gly								

<210> 86

<211> 219

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Вариант тио-антитела против CD79b (hu2F2.D7)-HC(A118C) - LC

<400> 86

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu
				20					25					30
Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
				35					40					45
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp
				50					55					60
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65					70					75
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
				80					85					90
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln
				95					100					105
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
				110					115					120
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
				125					130					135

Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
				140					145					150
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
				155					160					165
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				170					175					180
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
				185					190					195
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
				200					205					210
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
				215										

<210> 87

<211> 442

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант тимо-антитела против DC79b (hu2F2.D7)-LC(V205C) - HC

<400> 87

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Met	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr
				50					55					60
Asn	His	Ile	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Tyr	Leu	Trp	Gly	Gln
				95					100					105
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
				110					115					120
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
				125					130					135
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
				140					145					150
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				155					160					165
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				170					175					180

Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
				185					190					195
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
				200					205					210
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				215					220					225
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
				230					235					240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				245					250					255
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
				260					265					270
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
				290					295					300
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				305					310					315
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				320					325					330
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				335					340					345
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				350					355					360
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
				365					370					375
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				380					385					390
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				395					400					405
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				410					415					420
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
				425					430					435
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly								
				440										

<210> 88

<211> 219

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант тимо-антитела против CD79b (hu2F2.D7)-LC(V205C) - LC

<400> 88

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

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

<210> 89

<211> 219

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь антитела hu2F2.D7

<400> 89

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 90

<211> 442

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь антитела hu2F2.D7

<400> 90

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

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

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

Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60

Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val	Thr Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly Pro	Ser
110	115	120	
Val Phe Pro Leu	Ala Pro Ser Ser Lys	Ser Thr Ser Gly Gly	Thr
125	130	135	
Ala Ala Leu Gly	Cys Leu Val Lys Asp	Tyr Phe Pro Glu Pro	Val
140	145	150	
Thr Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ala Leu	Thr Ser Gly Val His	Thr
155	160	165	
Phe Pro Ala Val	Leu Gln Ser Ser Gly	Leu Tyr Ser Leu Ser	Ser
170	175	180	
Val Val Thr Val	Pro Ser Ser Ser Leu	Gly Thr Gln Thr Tyr	Ile
185	190	195	
Cys Asn Val Asn	His Lys Pro Ser Asn	Thr Lys Val Asp Lys	Lys
200	205	210	
Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys Thr	His Thr Cys Pro Pro	Cys
215	220	225	
Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly Gly Pro	Ser Val Phe Leu Phe	Pro
230	235	240	
Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu	Val
245	250	255	
Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser His	Glu Asp Pro Glu Val	Lys
260	265	270	
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
290	295	300	
Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr
305	310	315	
Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile Glu	Lys
320	325	330	
Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly Gln Pro	Arg Glu Pro Gln Val	Tyr
335	340	345	
Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Glu Glu Met	Thr Lys Asn Gln Val	Ser
350	355	360	
Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly Phe Tyr	Pro Ser Asp Ile Ala	Val
365	370	375	
Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr
380	385	390	
Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys
395	400	405	
Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln	Gln Gly Asn Val Phe	Ser
410	415	420	
Cys Ser Val Met	His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln	Lys

425

430

435

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

<210> 91
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 91
Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly
5 10

<210> 92
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 92
Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Thr
5 10

<210> 93
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 93
Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
5 10

<210> 94
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 94
Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 95
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 95
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 96
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 96
 Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
 5 10

<210> 97
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 97
 Lys Phe Asn Trp Tyr Cys Asp Gly Val Glu Val
 5 10

<210> 98
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 98
 Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
 5 10

<210> 99
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-NC-Вариант

<400> 99
 Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
 5 10

<210> 100
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-NC-Вариант

<400> 100
 Gln Val Gln Leu Cys Gln Pro Gly Ala Glu
 5 10

<210> 101
 <211> 11
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-НС-Вариант

<400> 101

Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Cys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr
				5					10	

<210> 102

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-НС-Вариант

<400> 102

Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Cys	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
				5					10	

<210> 103

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-НС-Вариант

<400> 103

Thr	Ser	Val	Thr	Val	Cys	Leu	Ala	Ser	Thr	Lys
				5					10	

<210> 104

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-НС-Вариант

<400> 104

Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
				5					10	

<210> 105

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-НС-Вариант

<400> 105

Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				5					10	

<210> 106

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-НС-Вариант

<400> 106
 Lys Phe Asn Trp Tyr Cys Asp Gly Val Glu Val
 5 10

<210> 107
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-HC-Вариант

<400> 107
 Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
 5 10

<210> 108
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-HC-Вариант

<400> 108
 Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
 5 10

<210> 109
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-LC-Вариант

<400> 109
 Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr
 5 10

<210> 110
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-LC-Вариант

<400> 110
 Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
 5 10

<210> 111
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-LC-Вариант

<400> 111
 Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
 5 10

<210> 112
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-LC-Вариант

<400> 112
 Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
 5 10

<210> 113
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-LC-Вариант

<400> 113
 Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
 5 10

<210> 114
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-LC-Вариант

<400> 114
 Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
 5 10

<210> 115
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Thio-hu2F2-LC-Вариант

<400> 115
 Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
 5 10

<210> 116
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-LC-Вариант

<400> 116
 Thr Leu Ser Val Thr Cys Gly Gln Pro Ala Ser
 5 10

<210> 117
 <211> 11
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-LC-Вариант

<400> 117

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 118

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-LC-Вариант

<400> 118

Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 119

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-LC-Вариант

<400> 119

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 120

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-LC-Вариант

 $\langle 400 \rangle$ 120

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 121

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-LC-Вариант

<400> 121

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 122

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Тио-антитело против CD79b (ch2F2)-LC-Вариант

<400> 122

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
 5 10

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
 TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
 GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
 CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTTCGCGGATCTGGCAGAG
 CCCACGTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
 CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
 GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
 CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
 CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
 ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
 CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
 CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
 CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
 GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
 GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCCAACCCCTTTCTGGACCCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
 GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
 GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
 GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
 TGGTCCAGAGCCCACAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCAGCAGAGCTTGGAAGGG
 CCATGGACCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCTCTCCCGCAACCAC
 TCCCACCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
 TGAGAAACCA

ФИГ.1

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMH CYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGENPGQE

Сигнальная последовательность
аминокислоты 1-28

Трансмембранный домен
аминокислоты 5-25, 159-179

Иммуноглобулиновый домен
аминокислоты 58-124

Иммунорецепторный тирозин-связывающий активационный мотив
аминокислоты 193-213

Участок N-гликозилирования
аминокислоты 73-76, 101-104, 127-130, 128-131

Участок фосфорилирования протеинкиназы C
аминокислоты 49-51, 60-62, 156-158, 212-214

Участок фосфорилирования киназы II казеина
аминокислоты 99-102, 156-159, 206-209, 221-224

Участок фосфорилирования тирозинкиназы
аминокислоты 113-120

Участок N-миристоилирования
аминокислоты 40-45, 118-123

ФИГ. 2

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD79b ЧЕЛОВЕКА (ch2F2)

GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCCGGTACCATTGGACAACCAGCCTCCAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTAT
TACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAGAGCGCCTAATTTATCTGGTGTCTAAACTGGATTCTGGA
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTGTTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCCG
GAGGGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

ФИГ. 3

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD79b ЧЕЛОВЕКА (ch2F2)

DIVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPERLIYLVSKLD SG
VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVCWQGT HFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФИГ. 4

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD79b ЧЕЛОВЕКА (ch2F2)

CAGGTTCAACTCCAGCAACCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
GACAAGGCCTTGAATGGATTGGTATGATTGATCCTTCAGACAGTGAAACTCACTACAATCAT
ATCTTCAAGGACAAGGCCACTTTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACTTGCAGCT
CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAATCTCTACTTGTGGG
GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTTAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG
GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA
CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT
TCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCT
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCAC
CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGG
AAGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

ФИГ. 5

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD79b ЧЕЛОВЕКА (ch2F2)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGLEWIGMIDPSDSETHYNH
IFKDKATLTVDKSSSTAYLQLSSLTSEDSAVYYCARNLYLWGQTSVTVSLASTKGPSVFP
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

ФИГ.6

Последовательности VL

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Контакт - CDR L1

huK1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W Y Q
 mu2F2 D I [V] M T Q [T] P [L] T L S [V] T I G [Q] P A S I [S] K S S Q S L L D S D G K T Y L N W [L] L
 hu2F2 с пересаженой D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W Y Q
 последовательностью hu2F2.D7 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W Y Q
 * *

Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Контакт - CDR L2

huK1 Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 mu2F2 Q [R] P G [Q] S P [E] R L I Y [L] V S [K] L [D] S G V P [D] R F [T] G S G S G T D F T L [K] I S [R] V E A
 hu2F2 с пересаженой Q K P G K A P K L L I Y [L] V S [K] L [D] S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 последовательностью hu2F2.D7 Q K P G K A P K L L I Y [L] V S [K] L [D] S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 * * * * *

Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Контакт - CDR L3

huK1 E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 9
 mu2F2 E D [L] G V Y Y C [W] Q [G] T H F P [Y] T F G [G] G T K V E I K R SEQ ID NO: 10
 hu2F2 с пересаженой E D F A T Y Y C [W] Q [G] T H F P [Y] T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 11
 последовательностью hu2F2.D7 E D F A T Y Y C [W] Q [G] T H F P [F] T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 12
 * * * * *

ФИГ.7

Последовательности VN

[illegible]

ФИГ.8А

Последовательности VH

Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	101	102	103	104

Kabat# 105 106 107 108 109 110 111 112 113

humIII	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 13
mu2F2	Q	G	T	S	V	T	V	S	L	SEQ ID NO: 14
hu2F2 с пересаженной последовательностью	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 15
hu2F2.D7	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 16

ФИГ.8B

									L3
									C 1 2 3 4 5 6 7 8
hu2F2 с пересаженной последовательностью									W Q G T H F P Y SEQ ID NO: 17
hu 2F2.D7									F Q G T H F P F SEQ ID NO: 18

ФИГ.9

Вариант 2F2	Biacore KD (нМ)		Иммобилизованный антиген
	Fab	IgG	
ch 2F2	108	2.7	hu CD79b.ecd-Fc
	111	1.4	hu CD79b.ecd
		2	15-мерный пептид
hu 2F2 с пересаженной последовательностью	NB	NB	hu CD79b.ecd-Fc
		NB	hu CD79b.ecd
hu 2F2.D7	68	3.9	hu CD79b.ecd
		2.7	16-мерный пептид

ФИГ.10

I				
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
II				
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
III				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Акцентор				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Второй акцентор				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-

ФИГ.11А

I				
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 36
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 37
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 38
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 39
II				
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 40
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 41
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 42
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 43
III				
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 44
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 45
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 46
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 47
Акцентор				
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 48
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 49
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50
Второй акцентор				
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 51
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 52
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 53
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 54

ФИГ.11В

kv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLIY	-L2-	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2	DIVMTQSPSLSLPVPTEGPASISC	-L1-	WYLQKPGQSPQLLIY	-L2-	GVPDRFGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSC	-L1-	WYQQKPGQAPRLIY	-L2-	GIPDRFGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC	-L1-	WYQQKPGQPPLLIY	-L2-	GVPDRFGSGSGTDFTLTISSLQA

EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 55
EDVGYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 56
EDFAVYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 57
EDVAVYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 58

ФИГ.12

А. Легкая цепь hu2F2.D7

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC (SEQ ID NO: 19)
 FR2-LC: WYQOKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 20)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC (SEQ ID NO: 21)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 22)
 HVR1-LC: KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 23)
 HVR2-LC: LVSKLDS (SEQ ID NO: 24)
 HVR3-LC: FQGTFFPFT (SEQ ID NO: 25)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 26)

Легкая цепь :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLDSDGKTYLNWYQOKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCFQGTFFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)

LC-вариабельный домен:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLDSDGKTYLNWYQOKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCFQGTFFPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 12)

В. Тяжелая цепь hu2F2.D7

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 27)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 28)
 FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 29)
 FR4-HC: WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
 HVR1-HC: GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 31)
 HVR2-HC: GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 32)
 HVR3-HC: ARNLYL (SEQ ID NO: 33)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 34)
 FC: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 35)

Тяжелая цепь :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
 DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 90)

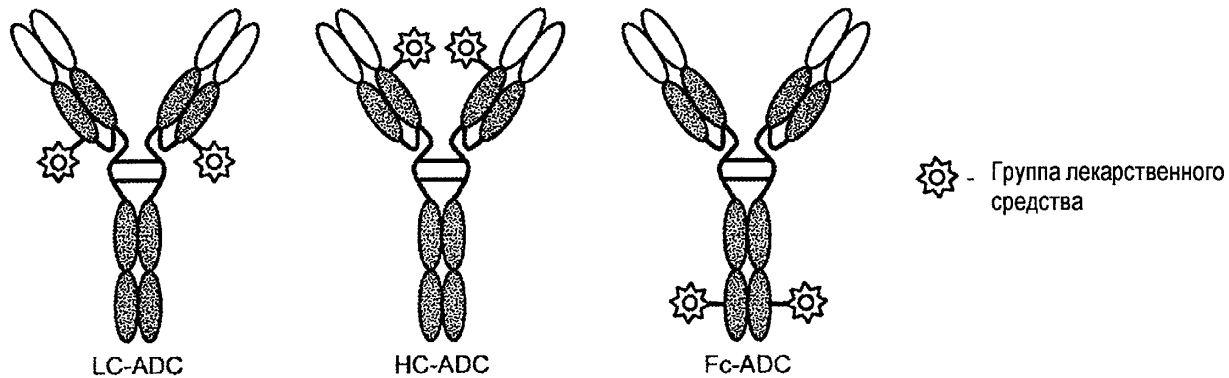
HC-вариабельный домен:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
 DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 16)

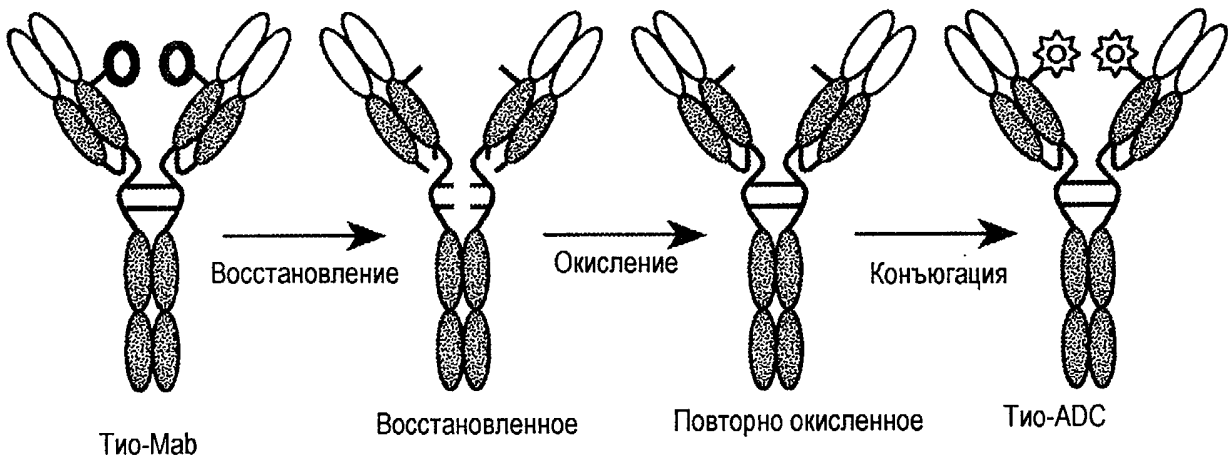
ФИГ.13

		Сигнальная последовательность	Тестируемый пептид			
hCD79b	1	MARLALSPVP	SHWMVALLLLLSAEP-VPAAR	SEDRYRNPKGSACSRIWQS 49		
CynCD79b	1	MARLALSPV	SSHWLVALLLLLSAAEPVPAAK	SEDLYPNPKGSACSRIWQS 50		
mCD79b	1	MATLVLS	SMPCHWLLFLLLLFS	SGEP-VPAMTSSDLPLNFQGSPCSQIWQH 49		
hCD79b	50	PRFIARKRGFTVKMHCY	MN-SASGNVSWLWKQ	EMDENPQQLKLEKGRMEE 98		
CynCD79b	51	PRFIARKRGFTVKMHCY	VTNSTFSIVSWLRKRE	TDKEPQQVNLEQGHMHQ 100		
mCD79b	50	PRFAAKKR	SSMVKFHCYTN--HS	GALTWFRKRGSQQPQELVSEEGRIVQ 96		
hCD79b	99	SQNE	SLATLTIQ	GIRFEDNGIYFCQ	QKCN-NTSEVYQCGGTELRLVMGFST 147	
CynCD79b	101	TQNS	SVTTLTIQ	DIRFEDNGIYFCQ	QEC-S-KTSEVYRCGGTELRLVMGFST 149	
mCD79b	97	TQNG	SVYTLTIQ	NIQYEDNGIYFCQ	KQKCDSANHNVTDS	CGTELLVVLGFST 146
Домен TM						
hCD79b	148	LAQLKQRNTLKDGIIMIQ	TLLIILFIIVPIFLLLDKDD	SKAGMEEDH	TYE 197	
CynCD79b	150	LAQLKQRNTLKDGIIMIQ	TLLIILFIIVPIFLLLDKDD	SKAGMEADH	TYE 199	
mCD79b	147	LQOLKRRNTLKDGIIL	IQTLIILFIIVPIFLLLDKDD	GKAGMEEDH	TYE 196	
Домен ITAM						
hCD79b	198	GLDIDQTATYEDIVTLRT	GEVKWSVGEHPGQE	229	SEQ ID NO: 2	
CynCD79b	200	GLDIDQTATYEDIVTLRT	GEVKWSVGEHPGQE	231	SEQ ID NO: 7	
mCD79b	197	GLNIDQTATYEDIVTLRT	GEVKWSVGEHPGQE	228	SEQ ID NO: 8	

ФИГ.14



ФИГ.15



ФИГ.16

Тяжелая цепь со встроенным цистеином тиро-Mab против CD79b A118C hu2F2.D7

A. Последовательность легкой цепи
Thio-hu2F2.D7-HC-A118C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGTHTFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 86)

B. Последовательность тяжелой цепи
Thio-hu2F2.D7-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKLEWVGMIIDPSDSETHYNIHFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGLTVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 85)

ФИГ.17

Легкая цепь со встроенным цистеином тиро-Mab против CD79b V205C hu2F2.D7

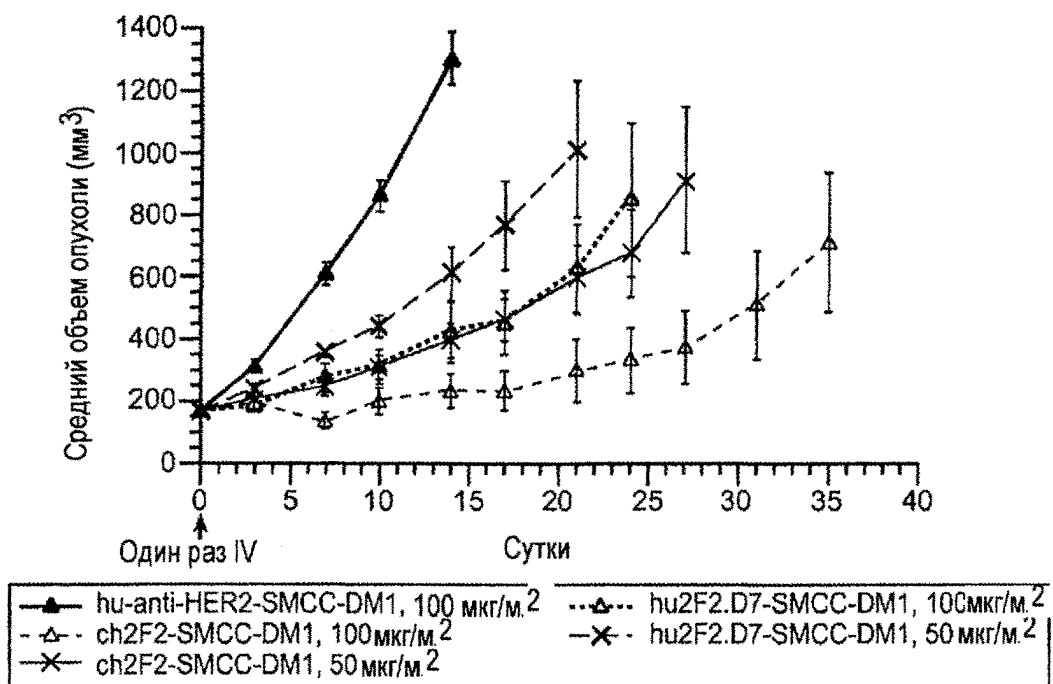
A. Последовательность легкой цепи
Thio-hu2F2.D7-LC-V205C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGTHTFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 88)

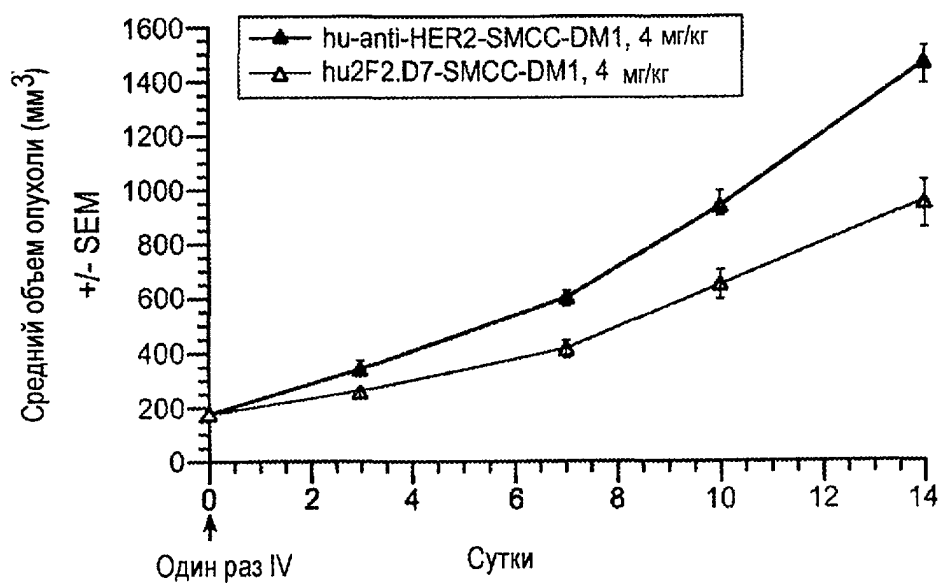
B. Последовательность тяжелой цепи
Thio-hu2F2.D7-LC-V205C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKLEWVGMIIDPSDSETHYNIHFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 87)

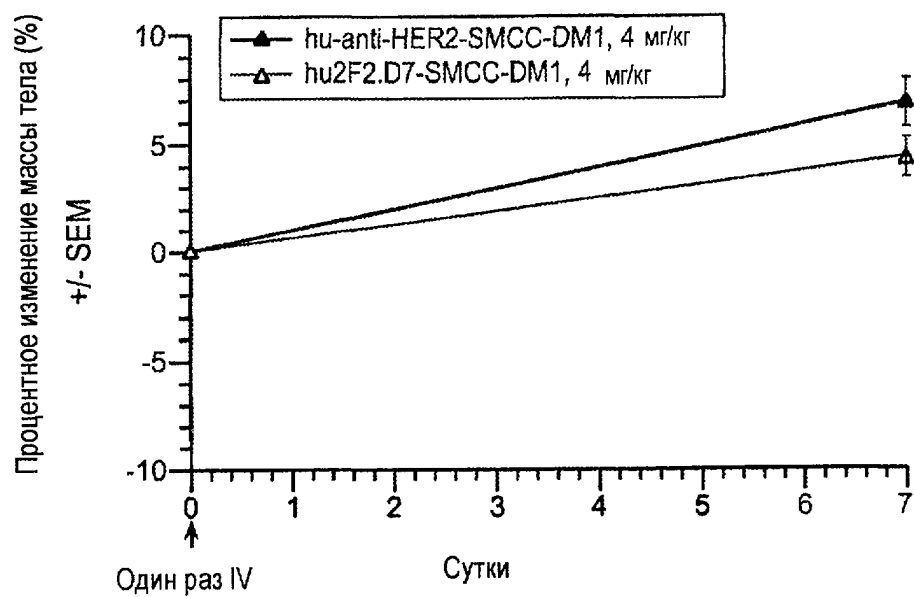
ФИГ.18



ФИГ.19



ФИГ.20А



ФИГ.20В