



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월29일

(11) 등록번호 10-1607346

(24) 등록일자 2016년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7019273

(22) 출원일자(국제) 2009년01월14일

심사청구일자 2014년01월10일

(85) 번역문제출일자 2010년08월30일

(65) 공개번호 10-2010-0124261

(43) 공개일자 2010년11월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/030924

(87) 국제공개번호 WO 2009/099728

국제공개일자 2009년08월13일

(30) 우선권주장

12/173,465 2008년07월15일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2006034488 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

제넨테크, 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자

첸, 이본

미국 94401 캘리포니아주 산마테오 8스 애비뉴 넘버320 222

데니스, 마크

미국 94070 캘리포니아주 산카를로스 폴리머스 애비뉴 120

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 78 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 항-CD 7 9 B 항체 및 면역접합체 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 포유동물에서 조혈 증양의 치료를 위해 유용한 CD79b에 대한 인간화 및 접합된 항체, 및 그를 위한 항체의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

```
CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTCTCCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCAAGGCGCAGGCTGGCGTTGTCTCTCTGT
GCCAGGCACTGGATGTGGGCTTGGCTGTCTGTCTGCTCAGCTGAGCCAGTACCCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTTCATAGCCAGGAACGGGGCTTACGGTGAAAATGCACCTGTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCGAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCTGGAAGAGTCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCCTACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGGAGCAATGGCATCTACTTCTGTCTGACGAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGCTTACAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCAATGGGATTCAGCACCTTGCG
ACAGCTGAAGCAGAGGAACCGCTGAGGATGGTATCATCATGATCCAGAGCTGTCTGAT
CATCCTTTCATCATCTGCTGCTATCTTCTGTCTGCTGAGCAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCTTGGACATTGACGACAGCAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGAGCTGCGGACAGGGGAGTGAAAGTGCTGTAGGTGAGCAGCCAGGCGAGGA
GTAAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCGAGGCTCCCTGGGCTCAGTGAGTCTCG
GAGCTGCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTCTCTGAGCCCGCCAGCTGGGCTCTGAAGCTG
GCCACACAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCTGGTCCCGAGCTCTTGCCAAAGGGCTG
GAGTAGAAGGACAAAGGCGAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGATGGAGGGGACCCA
GCCCTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCGCCACACATGGGATGGGGAGGCGAGAGC
TGGTCCAGAGCCCAAAATGGAGCTGGAGCCGAGGGCTCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGAGCCCACTGGGCCCCAGAGAGCCAGAGAACATCATCTCTCTCCCGAACCCAC
TCCACCCAGGAGGGCCCTGGCCTCCAGTGCTCTCCCGCTGGAATAAACGGTGTGTCTC
TGAGAAACCA
```

(72) 발명자

도난, 데이비드

미국 94404 캘리포니아주 산마테오 쇼어라인 드라이브 1058

엘킨스, 크리스티

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 메이플 애비뉴 524

주누틀라, 자가스, 레디

미국 94555 캘리포니아주 프레몬트 투펠로 스트리트 34391

폴손, 앤드류

미국 94131 캘리포니아주 샌프란시스코 버클리 웨이 281

첵, 빙

미국 94040 캘리포니아주 마운틴 뷰 몬텔레나 코트 156

(30) 우선권주장

61/025,137 2008년01월31일 미국(US)

61/032,790 2008년02월29일 미국(US)

61/054,709 2008년05월20일 미국(US)

PCT/US2008/070088 2008년07월15일 세계지적재산권기구(WIPO)(WO)

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함하고,

(a) (i) KASQSVDDYDGSFLN (서열 131), KASQSVDEYDGSFLN (서열 194), 또는 KASQSVDSGDSFLN (서열 213)인 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1, (ii) AASNLES (서열 132)인 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) QQSNEPLT (서열 133)인 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및

(b) (i) GYTFSSYWIE (서열 134)인 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1, (ii) GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)인 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) TRRVPIRLDY (서열 138)인 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인

을 포함하는, 항-CD79b 시스테인 조작된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 (i) KASQSVDDYDGSFLN (서열 131)인 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1, (ii) AASNLES (서열 132)인 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) QQSNEPLT (서열 133)인 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3을 포함하고; 중쇄 가변 도메인이 (i) GYTFSSYWIE (서열 134)인 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1, (ii) GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)인 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) TRRVPIRLDY (서열 138)인 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 것인, 시스테인 조작된 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 서열 188의 서열을 포함하고 중쇄 가변 도메인이 서열 189의 서열을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 (i) KASQSVDEYDGSFLN (서열 194)인 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1, (ii) AASNLES (서열 132)인 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) QQSNEPLT (서열 133)인 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3을 포함하고; 중쇄 가변 도메인이 (i) GYTFSSYWIE (서열 134)인 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1, (ii) GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)인 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) TRRVPIRLDY (서열 138)인 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 것인, 시스테인 조작된 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 서열 207의 서열을 포함하고 중쇄 가변 도메인이 서열 208의 서열을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 (i) KASQSVDSGDSFLN (서열 213)인 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1, (ii) AASNLES (서열 132)인 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) QQSNEPLT (서열 133)인 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3을 포함하고; 중쇄 가변 도메인이 (i) GYTFSSYWIE (서열 134)인 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1, (ii) GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)인 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) TRRVPIRLDY (서열 138)인 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 것인, 시스테인 조작된 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 서열 226의 서열을 포함하고 중쇄 가변 도메인이 서열 227의 서열을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산이 0.6 내지 1.0 범위의 티오 반응성 값을 갖는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄에 위치한 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인 조작된 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 경쇄에 위치한 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산 잔기가 카바트 넘버링 (Kabat numbering) 방식에 따른 경쇄의 위치 15, 110, 114, 121, 127, 168, 및 205로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 서열 278, 서열 279, 서열 280, 서열 281, 서열 282, 서열 283, 및 서열 284로부터 선택된 서열을 포함하는 시스테인 조작된 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 경쇄에 위치한 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산 잔기가 카바트 넘버링 방식에 따른 경쇄의 위치 205에서 유리 시스테인 아미노산을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 13

제10항에 있어서, 서열 284의 서열을 포함하는 시스테인 조작된 항체.

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄에 위치한 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인 조작된 항체.

청구항 15

제14항에 있어서, 중쇄에 위치한 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산 잔기가 카바트 넘버링 방식에 따른 중쇄의 위치 5, 23, 84, 및 112, 및 EU 넘버링 방식에 따른 중쇄의 위치 118, 120, 282, 375, 및 400으로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 16

제15항에 있어서, 서열 251, 서열 252, 서열 253, 서열 254, 서열 255, 서열 256, 서열 257, 서열 258, 및 서열 259로부터 선택된 서열을 포함하는 시스테인 조작된 항체.

청구항 17

제15항에 있어서, 중쇄에 위치한 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산 잔기가 EU 넘버링 방식에 따른 중쇄의 위치 118에서 유리 시스테인 아미노산을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 18

제17항에 있어서, 서열 255의 서열을 포함하는 시스테인 조작된 항체.

청구항 19

제15항에 있어서, 중쇄에 위치한 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산 잔기가 EU 넘버링 방식에 따른 중쇄의 위치 400에서 유리 시스테인 아미노산을 포함하는 것인 시스테인 조작된 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, 서열 259의 서열을 포함하는 시스템인 조작된 항체.

청구항 21

제1항에 있어서, 서열 231의 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 230의 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 시스템인 조작된 항체.

청구항 22

제1항에 있어서, 서열 233의 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 232의 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 시스템인 조작된 항체.

청구항 23

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 및 인간화 항체로부터 선택되는 시스템인 조작된 항체.

청구항 24

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단편인 시스템인 조작된 항체.

청구항 25

제24항에 있어서, 항원 결합 단편이 Fab 단편인 시스템인 조작된 항체.

청구항 26

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 27

제26항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 28

제27항의 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 29

제28항에 있어서, 원핵 숙주 세포인 숙주 세포.

청구항 30

하나 이상의 유리 시스템인 아미노산을 통해 세포독성제에 공유결합에 의해 부착된 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 시스템인 조작된 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 31

제30항에 있어서, 세포독성제가 독소, 화학요법제, 약물 모이어티 (moiety), 항생제, 방사성 동위원소, 및 핵산 분해 효소로부터 선택되는 것인 면역접합체.

청구항 32

포획 표지, 검출 표지, 또는 고체 지지체에 공유결합에 의해 부착된 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 33

제32항에 있어서, 항체가 포획 표지에 공유결합에 의해 부착되고, 포획 표지가 비오티ن 포획 표지를 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 34

제32항에 있어서, 항체가 검출 표지에 공유결합에 의해 부착되고, 검출 표지가 형광 염료 검출 표지를 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 35

제34항에 있어서, 형광 염료가 플루오레세인 유형, 로다민 유형, dansyl, 리사민 (Lissamine), 시아닌, 피코에리트린, 및 텍사스 레드 (Texas Red)로부터 선택되는 것인 면역접합체.

청구항 36

제32항에 있어서, 항체가 검출 표지에 공유결합에 의해 부착되고, 검출 표지가 ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At , 및 ^{213}Bi 로부터 선택되는 방사선헤중 검출 표지를 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 37

제32항에 있어서, 항체가 검출 표지에 공유결합에 의해 부착되고, 상기 항체가 킬레이팅 리간드에 의해 검출 표지에 공유결합에 의해 부착되는 것인 면역접합체.

청구항 38

제37항에 있어서, 킬레이팅 리간드가 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 (DOTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라(메틸렌 포스폰산) (DOTP), (1R,4R,7R,10R)- α , α' , α'' , α''' -테트라메틸-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산)테트라나트륨 염 (DOTMA), 2-[비스[2-[비스(카르복시메틸)아미노]에틸]아미노]아세트산 (DTPA), 및 트리에틸렌테트라민 (TETA)으로부터 선택되는 것인 면역접합체.

청구항 39

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민 결합 펩티드를 포함하는 시스템 조작된 항체.

청구항 40

제39항에 있어서, 알부민 결합 펩티드가 서열 246 내지 250으로부터 선택되는 것인 시스템 조작된 항체.

청구항 41

화학식 $\text{Ab}-(\text{L-D})_p$ 를 갖고, 이때

- (a) Ab는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체이고;
- (b) L은 링커이고;
- (c) D는 약물 모이어티이고;
- (d) p는 1 내지 8인,

면역접합체.

청구항 42

제41항에 있어서, L이 6-말레이미도카프로일 (MC), 말레이미도프로파노일 (MP), 발린-시트룰린 (val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (ala-phe), p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 (SMCC), 4-(2-피리딜티오)부티르산-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (SPDB), 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 (SIAB)로부터 선택된 링커를 포함하는 것인 면역접합체.

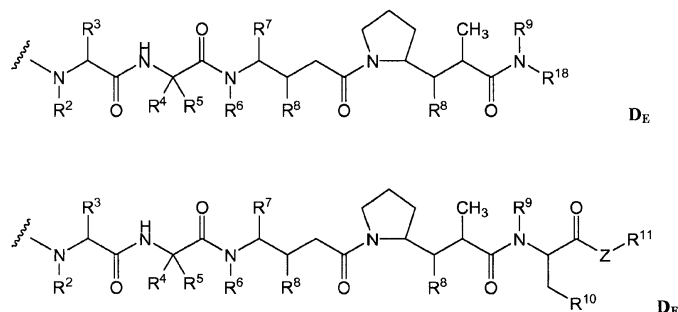
청구항 43

제41항에 있어서, D가 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 및 돌로스타틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 면

역접합체.

청구항 44

제43항에 있어서, D가 아우리스타틴 또는 돌로스타틴이고, 여기서 D가 하기 화학식 D_E 또는 D_F의 약물 모이어티인 면역접합체.



(상기 식에서, R² 및 R⁶은 각각 메틸이고, R³ 및 R⁴는 각각 이소프로필이고, R⁵는 H 및 메틸로부터 선택되고, R⁷은 sec-부틸이고, 각 R⁸은 CH₃, O-CH₃, OH, 및 H로부터 독립적으로 선택되고, R⁹는 H이고, R¹⁰은 아릴이고, Z는 -O- 또는 -NH-이고, R¹¹은 H, C₁-C₈ 알킬, 또는 -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃이고, R¹⁸은 -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-아릴임)

청구항 45

제41항에 있어서, D가 모노메틸아우리스타틴 E (MMAE) 및 모노메틸아우리스타틴 F (MMAF)로부터 선택되는 것인 면역접합체.

청구항 46

제41항에 있어서, 화학식 Ab-(L-모노메틸아우리스타틴 E)_p를 갖고, 이때 p가 2 내지 5 범위인 면역접합체.

청구항 47

제41항에 있어서, 화학식 Ab-(L-모노메틸아우리스타틴 F)_p를 갖고, 이때 p가 2 내지 5 범위인 면역접합체.

청구항 48

제41항에 있어서, L이 발린-시트룰린 (val-cit), 6-말레이미도카프로일 (MC), p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB), 또는 6-말레이미도카프로일-p-아미노벤질옥시카르보닐 (MC-PAB)을 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 49

제46항에 있어서, L이 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (MC-val-cit-PAB)을 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 50

제41항에 있어서, D가 메이탄시노이드인 면역접합체.

청구항 51

제50항에 있어서, 메이탄시노이드가 N(2')-테아세틸-N(2')-(3-머캅토-1-옥소프로필)-메이탄신 (DM1), N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-1-옥소펜틸)-메이탄신 (DM3), 및 N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신 (DM4)으로부터 선택되는 것인 면역접합체.

제41항에 있어서, p가 2 내지 4인 면역접합체.

청구항 55

제41항에 있어서, p가 3 내지 4인 면역접합체.

청구항 56

제1항 내지 제7항, 제21항, 및 제22항 중 어느 한 항의 항체, 또는 화학식 $Ab-(L-D)_p$ 를 갖는 면역접합체, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이며, 이때

- (a) Ab는 제1항 내지 제7항, 제21항, 및 제22항 중 어느 한 항의 항체이고;
- (b) L은 링커이고;
- (c) D는 약물 모이어티이고;
- (d) p는 1 내지 8인,

암의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 57

제1항 내지 제7항, 제21항, 및 제22항 중 어느 한 항의 항체, 또는 화학식 $Ab-(L-D)_p$ 를 갖는 면역접합체를 포함하는 의약이며, 이때

- (a) Ab는 제1항 내지 제7항, 제21항, 및 제22항 중 어느 한 항의 항체이고;
- (b) L은 링커이고;
- (c) D는 약물 모이어티이고;
- (d) p는 1 내지 8인,

암의 치료를 위한 의약.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 암이 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 (indolent) NHL, 불응성 (refractory) NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 (mantle cell) 림프종 으로부터 선택된 것인 의약.

청구항 59

제57항에 있어서, 유효량의 또 다른 치료제를 추가로 포함하는 의약.

청구항 60

제59항에 있어서, 치료제가 항체, 화학요법제, 세포독성제, 항-혈관신생제, 면역억제제, 전구약물, 시토킨, 시토킨 길항제, 세포독성 방사선 요법, 코르티코스테로이드, 암 백신, 또는 성장-억제제로 이루어진 군 으로부터 선택되는 것인 의약.

청구항 61

제59항에 있어서, 치료제가 벨케이트, 레블리미드, 타목시펜, 레트로졸, 엑세메스탄, 아나스트로졸, 이리노테칸, 세톡시맵, 플베스트란트, 비노렐빈, 에플로티닙, 베바시주맵, 빈크리스틴, 이마티닙, 소라페닙, 라파티닙, 또는 트라스투주맵, 시스플라틴, 겐시타빈, 메토티렉세이트, 빈블라스틴, 카르보플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 5-플루오로우라실, 독소루비신, 보르테조밐, 레날리도미드, 멜팔린, 프레드니손, 텍사메타손, 또는 도세탁셀로 이루어진 군 으로부터 선택되는 것인 의약.

청구항 62

제59항에 있어서, 치료제가 항-CD20 항체인 의약.

청구항 63

제59항에 있어서, 시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 및 독소루비신 중 하나 이상을 추가로 포함하는 의약.

청구항 64

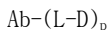
CD79b를 포함하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플을 제1항 내지 제7항, 제21항, 및 제22항 중 어느 한 항의 항체에 시험관내 노출시키는 단계 및 상기 샘플에서 CD79b에 대한 상기 항체의 결합을 결정하는 단계를 포함하며, 이때 상기 샘플에서 CD79b에 대한 상기 항체의 결합이 상기 샘플에서 CD79b가 존재함을 나타내는 것인, CD79b를 포함하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플에서 CD79b의 존재를 결정하는 시험관내 방법.

청구항 65

제1항 내지 제7항, 제21항, 및 제22항 중 어느 한 항의 항-CD79b 항체 (Ab) 및 아우리스타틴 또는 메이탄시노이드 약물 모이어티 (D)를 포함하는 항체-약물 접합체 화합물이며, 상기 항체가 링커 모이어티 (L)에 의해 하나 이상의 조작된 시스테인 아미노산을 통해 D에 부착되고, 상기 화합물이 하기 화학식 I을 갖는 것인 항체-약물 접합체 화합물의 제조 방법으로서,

- (a) 상기 항체의 조작된 시스테인기를 링커 시약과 반응시켜 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성하는 단계, 및
- (b) Ab-L을 활성화된 약물 모이어티 D와 반응시켜 항체-약물 접합체를 형성하는 단계를 포함하거나; 또는
- (c) 약물 모이어티의 친핵성 기를 링커 시약과 반응시켜 약물-링커 중간체 D-L을 형성하는 단계, 및
- (d) D-L을 항체의 조작된 시스테인기와 반응시켜 항체-약물 접합체를 형성하는 단계를 포함하는 방법.

<화학식 I>



(상기 식에서, p는 1, 2, 3 또는 4임)

청구항 66

제65항에 있어서, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 내에서 항체를 발현시키는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 발현된 항체를 환원제로 처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 환원제가 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP) 및 디티오프레이톨 (DTT)로부터 선택된 것인 방법.

청구항 69

제67항에 있어서, 발현된 항체를 환원제로 처리한 후에 산화제로 처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 산화제가 황산구리, 데히드로아스코르브산, 및 공기로부터 선택된 것인 방법.

청구항 71

- (a) i. 서열 194의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- ii. 서열 132의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- iii. 서열 133의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및

- (b) i. 서열 134의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- ii. 서열 135의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- iii. 서열 138의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3

을 포함하는 중쇄 가변 도메인

을 포함하는 시스테인 조작된 모노클로날 항-CD79b 항체를 포함하며, 이때 항체가 치료제에 공유결합에 의해 부착되는 것인 면역접합체.

청구항 72

- (a) i. 서열 131의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- ii. 서열 132의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- iii. 서열 133의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및

- (b) i. 서열 134의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- ii. 서열 135의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- iii. 서열 138의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3

을 포함하는 중쇄 가변 도메인

을 포함하는 시스테인 조작된 모노클로날 항-CD79b 항체를 포함하며, 이때 항체가 치료제에 공유결합에 의해 부착되는 것인 면역접합체.

청구항 73

화학식 $Ab-(L-D)_p$ 를 갖는 면역접합체이며, 이때

- (a) Ab는 시스테인 조작된 항체이며, 이때 항체는
 - i. a. 서열 194의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - b. 서열 132의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - c. 서열 133의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및

- ii. a. 서열 134의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- b. 서열 135의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- c. 서열 138의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3

을 포함하는 중쇄 가변 도메인

을 포함하는 단리된 모노클로날 항-CD79b 항체이고;

- (b) L은 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (MC-VC-PAB)인 링커이고;
- (c) D는 모노메틸아우리스타틴 E (MMAE)인 약물 모이어티이고;
- (d) p는 1 내지 8인,

면역접합체.

청구항 74

제73항에 있어서, 중쇄 가변 도메인이 서열 208의 아미노산 서열을 포함하고 경쇄 가변 도메인이 서열 207의 아

미노산 서열을 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 75

제73항에 있어서, 중쇄가 서열 232의 아미노산 서열을 포함하고 경쇄가 서열 233의 아미노산 서열을 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 76

화학식 $Ab-(L-D)_p$ 를 갖는 면역접합체이며, 이때

- (a) Ab는 시스테인 조작된 항체이며, 이때 항체는
 - i. a. 서열 131의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - b. 서열 132의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - c. 서열 133의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
 을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및
- ii. a. 서열 134의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- b. 서열 135의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- c. 서열 138의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3

을 포함하는 중쇄 가변 도메인
을 포함하는 단리된 모노클로날 항-CD79b 항체이고;

- (b) L은 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (MC-VC-PAB)인 링커이고;
- (c) D는 모노메틸아우리스타틴 E (MMAE)인 약물 모이어티이고;
- (d) p는 1 내지 8인,

면역접합체.

청구항 77

제76항에 있어서, 중쇄 가변 도메인이 서열 189의 아미노산 서열을 포함하고 경쇄 가변 도메인이 서열 188의 아미노산 서열을 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 78

제76항에 있어서, 중쇄가 서열 230의 아미노산 서열을 포함하고 경쇄가 서열 231의 아미노산 서열을 포함하는 것인 면역접합체.

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

청구항 241

삭제

청구항 242

삭제

청구항 243

삭제

청구항 244

삭제

청구항 245

삭제

청구항 246

삭제

청구항 247

삭제

청구항 248

삭제

청구항 249

삭제

청구항 250

삭제

청구항 251

삭제

청구항 252

삭제

청구항 253

삭제

청구항 254

삭제

청구항 255

삭제

청구항 256

삭제

청구항 257

삭제

청구항 258

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] <관련 출원과의 교차 참조>
- [0002] 37 CFR § 1.53(b) 하에 출원된 본 정규 출원은 각각의 전문이 본원에 참조로 포함되는, 2008년 1월 31일 미국 특허 가출원 61/025,137, 2008년 2월 29일 출원된 미국 특허 가출원 61/032,790, 및 2008년 5월 20일 출원된 미국 특허 가출원 61/054,709의 35 USC § 119(e) 하의 우선권을 주장한다.
- [0003] 본 발명은 포유동물에서 조혈계 종양의 치료에 유용한 조성물, 및 그를 위한 상기 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 악성 종양 (암)은 미국에서 심장 질병 다음으로 두 번째의 주요 사인이다 (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993)). 암은 증식하여 종양 덩어리를 형성하는, 정상 조직으로부터 유래되는 비정상적 또는 신생물성 세포의 수 증가, 이들 신생물성 종양 세포에 의한 인접 조직의 침습, 및 결국 전이로 불리는 과정을 통해 국소 림프절 및 먼 부위로 혈액 또는 림프계를 통해 확산하는 악성 세포의 생성을 특징으로 한다. 암성 상태에서, 세포는 정상 세포가 성장하지 않을 조건 하에 증식한다. 암은 상이한 정도의 침습성 및 공격성을 특징으로 하는 매우 다양한 형태로 나타난다.
- [0005] 혈액의 세포 성분, 예를 들어 림프구, 백혈구, 혈소판, 적혈구 및 천연 킬러 (natural killer) 세포가 생성되는 과정인 조혈과정 동안 생성되는 세포를 포함하는 암이 조혈계 암으로서 칭해진다. 혈액 및 림프 조직에서 발견할 수 있고 면역 반응에 중요한 림프구는 각각 체액성 및 세포 매개성 면역을 매개하는 2가지 주요 클래스의 림프구: B 림프구 (B 세포) 및 T 림프구 (T 세포)로 분류된다.
- [0006] B 세포는 골수 내에서 성숙하고, 그들의 세포 표면 상에 항원-결합 항체를 발현하는 골수를 떠난다. 나이브 (naive) B 세포가 그의 막-결합된 항체에 특이적인 항원과 처음 마주치면, 세포는 빠르게 분열하기 시작하고 그의 자손은 기억 B 세포 및 효과기 (effector) 세포 ("혈장 세포"로 불림)로 분화한다. 기억 B 세포는 수명이 보다 길고, 본래의 모 세포와 동일한 특이성을 갖는 막-결합된 항체를 계속 발현한다. 혈장 세포는 막-결합된 항체를 생산하지 않지만, 대신에 분비될 수 있는 형태의 항체를 생산한다. 분비된 항체는 체액성 면역의 주 효과기 분자이다.
- [0007] T 세포는 미성숙 T 세포의 증식 및 분화를 위한 환경을 제공하는 흉선 내에서 성숙한다. T 세포 성숙 동안, T 세포는 T-세포 수용체를 생성하는 유전자 재배열, 및 성숙 T 세포의 세포-표면 표현형을 결정하는 것을 돕는 양성 및 음성 선택을 겪는다. 성숙 T 세포의 특징적인 세포 표면 마커 (marker)는 CD3:T-세포 수용체 복합체 및 공동수용체 중 하나, 즉 CD4 또는 CD8이다.
- [0008] 암 요법을 위한 효과적인 세포성 표적을 발견하기 위한 시도에서, 연구자들은 하나 이상의 정상 비-암성 세포 (들)에 비해 하나 이상의 특정 종류(들)의 암 세포의 표면 상에서 특이적으로 발현되는 막횡단 (transmembrane) 또는 막-회합된 폴리펩티드를 확인하고자 하였다. 종종, 그러한 막-회합된 폴리펩티드는 비-암성 세포의 표면에 비해 암 세포의 표면 상에서 보다 풍부하게 발현된다. 그러한 종양-연관 세포 표면 항원 폴리펩티드의 확인은 항체-기반 요법을 통한 파괴를 위해 암 세포를 특이적으로 표적화하는 능력을 생성시켰다. 이와 관련하여, 항체-기반 요법은 특정 암의 치료에서 매우 효과적인 것으로 입증된 것이 알려져 있다. 예를 들어, HERCEPTIN® 및 Rituxan® (둘 모두 제넨테크 인크. (Genentech Inc., 미국 캘리포니아주 사우스샌프란시스코))은 각각 유방암 및 비-호지킨 (Hodgkin) 림프종을 치료하기 위해 성공적으로 사용되고 있는 항체이다. 보다 구체적으로, HERCEPTIN®은 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2) 원-종양유전자 (proto-oncogene)의 세포외 도메인에 선택적으로 결합하는 재조합 DNA-유래된 인간화 모노클로날 항체이다. HER2 단백질 과다발현은 원발 유방암의 25-30%에서 관찰된다. Rituxan®은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 생성된 유전학적으로 조작된 키메라 (chimera) 뮤린/인간 모노클로날 항체이다. 이들 두 항체는 CHO 세포에서 재조합 방식으로 생산된다.
- [0009] 암 요법을 위한 효과적인 세포성 표적을 발견하기 위한 다른 시도에서, 연구자들은 (1) 하나 이상의 특정 종류 (들)의 비-암성 정상 세포(들)에 비해 하나 이상의 특정 종류(들)의 암 세포(들)에 의해 특이적으로 생산되는 비-막-회합 폴리펩티드, (2) 하나 이상의 정상 비-암성 세포(들)보다 유의하게 더 높은 발현 수준으로 암 세포에 의해 생산되는 폴리펩티드, 또는 (3) 암성 및 비-암성 상태 모두 (예를 들어, 정상 전립선 및 전립선 종양 조직)에서 그의 발현이 단일 (또는 매우 제한된 수의 상이한) 조직 종류(들)에만 특이적으로 제한되는 폴리펩티

드를 확인하고자 하였다. 상기 폴리펩티드는 세포 내에 위치할 수 있거나, 암 세포에 의해 분비될 수 있다. 또한, 그러한 폴리펩티드는 암 세포 자체에 의해서가 아니라, 오히려 암 세포에 대한 강화 또는 성장-향상 효과를 갖는 폴리펩티드를 생산 및/또는 분비하는 세포에 의해 발현될 수 있다. 상기 분비형 폴리펩티드는 종종 암 세포에 정상 세포에 비해 성장 잇점을 제공하는 단백질이고, 예를 들어 혈관신생 인자, 세포성 부착 인자, 성장 인자 등과 같은 물질을 포함한다. 상기 비-막 회합형 폴리펩티드의 길항제의 확인은 그러한 암의 치료를 위한 효과적인 치료제로서 역할을 하는 것으로 예상될 것이다. 또한, 상기 폴리펩티드의 발현 패턴의 확인은 포유동물에서 특정 암의 진단을 위해 유용할 것이다.

[0010]

포유동물 암 요법에서 상기 확인된 진보에도 불구하고, 포유동물에서 종양의 존재를 검출할 수 있고 신생물성 세포 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 추가의 치료제가 각각 매우 필요하다. 따라서, 본 발명의 목적은 암성 및 비-암성 상태 모두에서 그의 발현이 단일 (또는 매우 제한된 수의 상이한) 조직 종류(들), 조혈 조직에만 특이적으로 제한되는 폴리펩티드, 세포 막-회합형, 분비형 또는 세포내 폴리펩티드를 확인하고, 포유동물에서 조혈계 암의 치료 목적의 처치 및/또는 검출에 유용한 조성물을 생산하기 위해 이들 폴리펩티드 및 그의 코딩 핵산을 사용하는 것이다.

[0011]

CD79는 CD79a (Ig α , mb-1) 및 CD79b (Ig β , B29)를 함유하는 공유 이중이량체로 이루어지는 B-세포 수용체의 신호전달 성분이다. CD79a 및 CD79b는 각각 세포의 면역글로불린 (Ig) 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인, 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM) 도메인을 함유한다. CD79는 B 세포 상에서 및 비-호지킨 림프종 세포 (NHL)에서 발현된다 ([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)]). CD79a 및 CD79b 및 sIg가 모두 CD79의 표면 발현을 위해 요구된다 (Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol., 13(3): 270-7)). NHL 상에서 CD79b의 평균 표면 발현은 정상 B-세포 상에서와 유사하지만, 범위가 더 크다 (Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol., 13(3): 270-7 (2001)).

[0012]

CD79b의 발현이 제시되면, 특히 만성 치료를 위해 환자에게 투여될 때 항원성이 최소이거나 없는, CD79b 항원에 대한 치료 항체를 생산하는 것이 유익하다. 본 발명은 상기 필요와 다른 필요를 충족시킨다. 본 발명은 현재의 치료 조성물의 한계를 극복하는 항-CD79b 항체를 제공하고, 또한 아래 상세한 설명으로부터 명백할 추가의 잇점을 제공한다.

[0013]

암의 치료에서 세포독성제 또는 세포 증식 억제제, 즉 종양 세포를 치사시키거나 억제하는 약물의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체 (ADC), 즉, 면역접합체의 사용 ([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)은 종양으로의 약물 모이어티 (moiety)의 표적화된 전달, 및 그 내부의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 이들 비접합된 약물 물질의 전신 투여는 제거하고자 하는 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 ([Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05]; [Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]). ADC의 치료 지수, 즉, 최대 효능 및 최소 독성을 개선하기 위한 노력은 약물-연결 및 약물-방출 특성 (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549)뿐만 아니라 폴리클로날 항체 (Rowland et al. (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87) 및 모노클로날 항체 (mAb)의 선택성에 초점을 맞추었다. 항체 약물 접합체에 사용되는 약물 모이어티는 박테리아 단백질 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 단백질 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 아우리스타틴 (auristatin), 겔다나마이신 ([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]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 ([Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342]), 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신 (Rowland et al. (1986), 상기 문헌)을 포함한다. 약물 모이어티는 튜블린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제제를 포함한 세포독성 및 세포 증식 억제 메커니즘에 영향을 줄 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성이거나 활성이 작은 경향이 있다.

[0014]

아우리스타틴 펩티드, 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체) (WO 02/088172)가 (i) 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 Lewis Y에 특이적인); (ii) 혈액암 상의 CD30에

특이적인 cAC10 ([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) CD20-발현 암 및 면역 질환의 치료를 위한 항-CD20 항체, 예를 들어 Rituxan (WO 04/032828); (iv) 결장직장암 치료를 위한 항-EphB2R 항체 2H9 (Mao, et al. (2004) Cancer Research 64(3): 781-788); (v) E-선택틴 항체 (Bhaskar et al. (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); (vi) 트라스투주맙 (HERCEPTIN®, US 2005/0238649), 및 (vii) 항-CD30 항체 (WO 03/043583)에 약물 모이어티로서 접합되었다. 아우리스타틴 E의 변이체는 US 5767237 및 US 6124431에 개시되어 있다. 모노클로날 항체에 접합된 모노메틸 아우리스타틴 E는 2004년 3월 28일 간행된 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623]에 개시되어 있다. 아우리스타틴 유사체 MMAE 및 MMAF가 각종 항체에 접합되었다 (US 2005/0238649).

[0015]

약물 모이어티를 항체에 부착시키는, 즉, 공유결합을 통해 연결시키는 통상적인 수단은 일반적으로 약물 모이어티가 항체 상의 많은 부위에 부착되는 분자의 불균질 혼합물을 생성시킨다. 예를 들어, 세포독성 약물은 대개 항체의 종종 수많은 리신 잔기를 통해 항체에 접합되어, 불균질 항체-약물 접합체 혼합물을 생성한다. 반응 조건에 따라, 불균질 혼합물은 대개 0 내지 약 8개 이상의 부착된 약물 모이어티를 갖는 항체의 분포를 포함한다. 추가로, 약물 모이어티 대 항체의 특정 정수비를 갖는 접합체의 각각의 하위군 내에 약물 모이어티가 항체 상의 다양한 부위에 부착되는 잠재적으로 불균질 혼합물이 존재한다. 분석 및 제조 방법은 접합 반응으로부터 생성되는 불균질 혼합물 내에서 항체-약물 접합체 중 분자를 분리하고 특성화하기에 부적당할 수 있다. 항체는 종종 많은 반응성 관능기를 갖는 크고 복잡하고 구조상 다양한 생체분자이다. 그들의 링커 시약 및 약물-링커 중간체와의 반응성은 pH, 농도, 염 농도, 및 보조-용매와 같은 인자에 의존적이다. 또한, 단단계 접합 과정은 반응 조건을 제어하고 반응물 및 중간체를 특성화하는 어려움 때문에 재현가능하지 않을 수 있다.

[0016]

pH 7 부근에서 양성자첨가되고 덜 친핵성인 대부분의 아민과는 달리, 시스테인 티올은 중성 pH에서 반응성이다. 유리 티올 (RSH, 술폰히드릴)기는 비교적 반응성이므로, 시스테인 잔기를 갖는 단백질은 종종 디설피드-연결된 올리고머로서 산화된 형태로 존재하거나, 내부에 가교된 디설피드기를 갖는다. 세포의 단백질은 일반적으로 유리 티올을 갖지 않는다 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, at page 55). 항체 시스테인 티올기는 일반적으로 항체 아민 또는 히드록실기보다 친전자성 접합 시약에 대해 더 반응적이고, 즉, 더 친핵성이다. 시스테인 잔기는 유전 공학 기술에 의해 단백질 내로 도입되어, 리간드에 공유결합에 의한 부착 형성하거나 새로운 분자내 디설피드 결합을 형성하였다 ([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). 그러나, 시스테인 아미노산에 대한 단백질의 다양한 아미노산 잔기의 돌연변이에 의한 시스테인 티올기에서의 조작은, 특히 쌍을 이루지 않은 (유리 Cys) 잔기 또는 반응 또는 산화반응을 위해 비교적 접근가능한 것의 경우에 잠재적으로 문제가 된다. 이. 콜라이 (*E. coli*)의 주변세포질, 배양 상등액, 또는 부분적으로 또는 완전히 정제된 단백질 내에서는 단백질의 농축 용액에서, 단백질의 표면 상의 쌍을 이루지 않은 Cys 잔기는 쌍을 이루고 산화되어 분자내 디설피드를 형성할 수 있고, 따라서 단백질 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다. 디설피드 이량체 형성은 새로운 Cys가 약물, 리간드, 또는 다른 표지 (label)에의 접합에 대해 비반응성이 되도록 한다. 또한, 단백질이 새로 조작된 Cys와 존재하는 Cys 잔기 사이에서 분자내 디설피드 결합을 산화에 의해 형성하면, 두 Cys 티올기는 활성 부위 참여 및 상호작용에 이용가능하지 않다. 또한, 단백질은 미스폴딩 (misfolding) 또는 3차 구조의 손실에 의해 불활성 또는 비-특이적으로 될 수 있다 (Zhang et al. (2002) Anal. Biochem. 311: 1-9).

[0017]

시스테인-조작된 항체는 FAB 항체 단편 (thioFab)으로서 설계되고, 전장, IgG 모노클로날 (thioMab) 항체로서 표현된다 ([Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol. Methods 332:41-52]; US 2007/0092940, 그 내용을 참조로 포함된다). ThioFab 및 ThioMab 항체는 새로 도입된 시스테인 티올에서 링커를 통해 티올-반응성 링커 시약 및 약물-링커 시약과 접합되어, 항체 약물 접합체 (Thio ADC)를 생성하였다.

[0018]

특허 출원 및 공개를 포함한 본원에 인용된 모든 참조문은 그 전문이 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0019]

본 발명은 항-CD79b 항체 또는 그의 기능성 단편, 및 조혈계 종양의 치료에서 그의 사용 방법을 제공한다.

[0020]

한 측면에서, 본 발명은 상기하거나 아래에서 설명되는 임의의 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합하

는 항체를 제공한다. 임의로, 항체는 그의 각각의 항원 에피토프에 대한 항-CD79b 폴리펩티드 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 모노클로날 항체, 항체 단편, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 디아바디(diabody), 단일 도메인 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일쇄 항체 또는 항체이다. 본 발명의 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 독소, 예를 들어, 아우리스타틴, 메이탄시노이드, 돌로스타틴 유도제 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 핵산분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의로 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있고, 바람직하게는 항체가 결합하는 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 검출 목적을 위해, 본 발명의 항체는 검출가능하게 표지되거나 고체 지지체 등에 부착될 수 있다.

[0021] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 항체의 일가 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 Fab 단편으로서 항체의 친화도) 또는 이가 형태의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG 단편으로서 항체의 친화도)가, 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지는 무린 항체 (예를 들어, CD79b에 대한 Fab 단편 또는 IgG 단편으로서 무린 항체의 친화도) 또는 키메라 항체 (예를 들어, CD79b에 대한 Fab 단편 또는 IgG 단편으로서 키메라 항체의 친화도)의 일가 친화도 또는 이가 형태의 친화도와 각각 실질적으로 동일하거나, 더 낮거나, 더 높은 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0022] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.4 nM, 0.2 nM 또는 0.5 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0023] 한 측면에서,

[0024] (i) 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1 (여기서, A1-A15는 KASQSVYDYGDSFLN (서열 131)임),

[0025] (ii) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 (여기서, B1-B7은 AASNLES (서열 132)임),

[0026] (iii) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 (여기서, C1-C9는 QQSNEPLT (서열 133)임),

[0027] (iv) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 (여기서, D1-D10은 GYTFSSYWIE (서열 134)임),

[0028] (v) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 (여기서, E1-E18은 GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)임), 및

[0029] (vi) 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3 (여기서, F1-F10은 TRRVVPYFDY (서열 136)임)

[0030] 으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는, CD79b에 결합하는 항체를 제공한다.

[0031] 한 측면에서, 변이체 HVR 서열이 서열 131, 132, 133, 134, 135 또는 136에 제시된 서열의 적어도 하나의 잔기의 변형을 포함하는 적어도 하나의 변이체 HVR을 포함하는, CD79b에 결합하는 항체를 제공한다.

[0032] 한 측면에서, 본 발명은 도 15에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 164-166)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0033] 한 측면에서, 본 발명은 도 15에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 156-158)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0034] 한 측면에서, 본 발명은 도 16에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 183-185)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0035] 한 측면에서, 본 발명은 도 16에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 175-177)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0036] 한 측면에서, 본 발명은 도 17에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 202-204)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0037] 한 측면에서, 본 발명은 도 17에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 194-196)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0038] 한 측면에서, 본 발명은 도 18에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 221-223)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0039] 한 측면에서, 본 발명은 도 18에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 213-215)을 포함하는

경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

- [0040] 한 측면에서, 본 발명은 서열 170, 189, 208 및 227 중에서 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD79b 항체를 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명은 서열 169, 188, 207 및 226 중에서 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD79b 항체를 포함한다.
- [0041] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산, 및 서열 251-298 중에서 선택되는 서열을 포함하는 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 포함한다. 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 CD79b 폴리펩티드에 결합할 수 있다. 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 모 항-CD79b 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 교체하는 것을 포함하는 공정에 의해 제조할 수 있다.
- [0042] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함하는 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 포함하고, 여기서 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 CD79b 폴리펩티드에 결합하고, 모 항-CD79b 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 교체하는 것을 포함하는 공정에 의해 제조되고, 여기서 모 항체는
- [0043] (a) 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1 (여기서, A1-A15는 KASQSVDDYDGSFLN (서열 131) 또는 KASQSVDDYEGDSFLN (서열 137)임);
- [0044] (b) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 (여기서, B1-B7은 AASNLES (서열 132)임);
- [0045] (c) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 (여기서, C1-C9는 QQSNEPLT (서열 133)임);
- [0046] (d) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 (여기서, D1-D10은 GYTFSSYWIE (서열 134)임);
- [0047] (e) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 (여기서, E1-E18은 GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)임); 및
- [0048] (f) 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3 (여기서, F1-F10은 TRRVVPVFDY (서열 136) 또는 TRRVPIRLDY (서열 138)임) 중에서 선택되는 적어도 하나의 HVR 서열을 포함한다.
- [0049] 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 그의 각각의 항원 에피토프에 대한 항-CD79b 폴리펩티드 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일쇄 항체 또는 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 독소, 예를 들어, 아우리스타틴 또는 메이탄시노이드에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의로 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있고, 바람직하게는 항체가 결합하는 세포의 성장 또는 증식을 억제하거나 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 진단 목적을 위해, 본 발명의 항체는 검출가능하게 표지되거나 고체 지지체 등에 부착될 수 있다.
- [0050] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 CD79b 항체 (본원에 정의된 바와 같이 전장 및 그의 단편을 포함한다)를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 적합한 숙주 세포 내에서 상기 항체 (또는 그의 단편)를 코딩하는 본 발명의 재조합 벡터를 발현시키고, 상기 항체를 회수하는 것을 포함한다.
- [0051] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체, 및 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 제제에 관한 것이다.
- [0052] 한 측면에서, 본 발명은 용기; 및 용기 내에 담긴 조성물을 포함하는 제품을 제공하고, 여기서 조성물은 본 발명의 하나 이상의 CD79b 항체를 포함한다.
- [0053] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 CD79b 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 제1 용기; 및 버퍼를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0054] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 CD79b 항체의 용도를 제공한다.
- [0055] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 제품의 용도를 제공한다.
- [0056] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 키트의 용도를 제공한다.
- [0057] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 세포를 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 세포의 성장의 억제를 유발하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세

포도독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.

- [0058] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물을 치료 목적으로 처치하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 포유동물에게 치료 유효량의 본 발명의 항체를 투여하여, 상기 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0059] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b의 증가된 발현과 연관된 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 그러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하여, 상기 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 증식성 장애는 암이다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0060] 한 측면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜, 상기 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는, 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 세포의 성장은 CD79b의 성장 강화 효과에 적어도 부분적으로 의존적이다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0061] 한 측면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜, 상기 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 포유동물에서 종양을 치료 목적으로 처치하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 종양의 성장은 CD79b의 성장 강화 효과에 적어도 부분적으로 의존적이다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0062] 한 측면에서, 본 발명은 환자에게 본원에 기재된 면역접합체, 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 제제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0063] 한 측면에서, 본 발명은 세포를 CD79b에 대한 면역접합체의 결합을 허용하는 조건 하에 본 발명의 항체를 포함하는 면역접합체에 노출시키는 것을 포함하는, B 세포 증식을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0064] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b를 함유하는 것으로 의심되는 샘플 내에서 CD79b의 존재를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 샘플을 본 발명의 항체에 노출시키고, 상기 샘플 내의 CD79b에 대한 항체의 결합을 결정하는 것을 포함하고, 여기서 상기 샘플 내의 CD79b에 대한 상기 항체의 결합이 상기 샘플 내에 상기 단백질이 존재함을 나타낸다.
- [0065] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b를 발현하는 세포, 예를 들어 B 세포의 증가와 연관된 세포 증식성 장애를 진단하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 생물학적 샘플 내의 시험 세포를 임의의 상기 항체와 접촉시키고; CD79b에 대한 항체의 결합을 검출함으로써 샘플 내의 시험 세포에 결합된 항체의 수준을 결정하고; 대조 샘플 내의 세포에 결합된 항체의 수준에 비교하는 것을 포함하고, 여기서 결합된 항체의 수준은 시험 및 대조 샘플 내의 CD79b-발현 세포의 수로 표준화되고, 대조 샘플에 비해 시험 샘플 내의 결합된 항체의 수준의 더 높은 것이 CD79b를 발현하는 세포와 연관된 세포 증식성 장애의 존재를 나타낸다.
- [0066] 한 측면에서, 본 발명은 혈액 또는 혈청 내에서 가용형 CD79b를 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 B 세포 증식성 장애를 겪는 것으로 의심되는 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 시험 샘플을 본 발명의 항-CD79b 항체와 접촉시키고, 정상 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 대조 샘플에 비해 시험 샘플 내에서 가용형 CD79b의 증가를 검출하는 것을 포함한다.
- [0067] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 CD79b를 발현하는 세포에 결합시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 세포를 본 발명의 항체와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.

도면의 간단한 설명

- [0068] 도 1은 PR036249 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (서열 1)을 도시한 것이고, 여기서 서열 1은 본원에서 "DNA225786"으로서 지칭된 클론 (본원에서 "CD79b"로서도 언급됨)이다. 뉴클레오티드 서열은 CD79b를 코딩하고, 여기서 출발 및 정지 코돈을 굵은 글씨체로 밑줄로 표시한다.
- 도 2는 도 1에 제시된 서열 1의 코딩 서열로부터 유래된 아미노산 서열 (서열 2)를 도시한 것이다.
- 도 3은 키메라 CD79b 무린 항체 (chMA79b) IgG1 (MA79b는 무린 모노클로날 항-CD79b 항체임)의 경쇄의 뉴클레오티드 서열 (서열 3)을 도시한 것이다. 뉴클레오티드 서열은 chMA79b의 경쇄를 코딩하고, 여기서 출발 및 정

지 코돈은 굵은 글씨체로 밑줄로 표시한다.

도 4는 도 3에 제시된 서열 3의 코딩 서열로부터 유래된, 처음 18개 아미노산 신호 서열이 빠진 아미노산 서열 (서열 4)을 도시한 것이다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다.

도 5는 키메라 뮤린 항체 (chMA79b) IgG1 (MA79b는 뮤린 모노클로날 항-CD79b 항체임)의 중쇄의 뉴클레오티드 서열 (서열 5)을 도시한 것이다. 뉴클레오티드 서열은 chMA79b의 중쇄를 코딩하고, 여기서 출발 및 정지 코돈은 굵은 글씨체로 밑줄로 표시한다.

도 6은 도 5에 제시된 서열 5의 코딩 서열로부터 유래된, 처음 18개 아미노산 신호 서열과 정지 코돈 앞의 마지막 리신 (K)이 빠진 아미노산 서열 (서열 6)을 도시한 것이다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다.

도 7a-b는 다음에 대한 가변 경쇄의 서열의 정렬을 도시한 것이다: VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3, VL-FR4 (각각 서열 139-142)을 갖는 경쇄 인간 카파 I 컨센서스 서열 ("huKI"로 표지함; 서열 9), 뮤린 항-CD79b 항체 ("MA79b"로 표지함; 서열 10), MA79b-이식된 (grafted) "인간화" 항체 ("huMA79b 이식편 (graft)"로 표지함; 서열 11), MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 17 ("huMA79b.v17"로 표지함; 서열 169), MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 18 ("huMA79b.v18"로 표지함; 서열 188), MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 28 ("huMA79b.v28"로 표지함; 서열 207) 및 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 32 ("huMA79b.v32"로 표지함; 서열 226). 위치는 카바트 (Kabat)에 따라 넘버링하고 (numbering), MA79b로부터 가변 경쇄 카파 I 컨센서스 프레임워크로 이식된 초가변 영역 (HVR)은 네모로 표시한다.

도 8a-b는 다음에 대한 가변 중쇄의 서열의 정렬을 도시한 것이다: VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3, 및 VH-FR4 (서열 143-146)를 갖는 중쇄 인간 하위군 III 컨센서스 서열 ("huIII"로 표지함; 서열 13), 뮤린 항-CD79b 항체 ("MA79b"로 표지함; 서열 14), MA79b-이식된 "인간화" 항체 ("huMA79b 이식편"로 표지함; 서열 15) (71A, 73T 및 78A 함유), MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 17 ("huMA79b.v17"로 표지함; 서열 170) (71A, 73T 및 78A 함유), MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 18 ("huMA79b.v18"로 표지함; 서열 189) (71A, 73T 및 78A 함유), MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 28 ("huMA79b.v28"로 표지함; 서열 208) (71A, 73T 및 78A 함유) 및 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 32 ("huMA79b.v32"로 표지함; 서열 227) (71A, 73T 및 78A 함유). 위치는 카바트에 따라 넘버링하고, MA79b로부터 가변 중쇄 하위군 III 컨센서스 프레임워크로 이식된 초가변 영역 (HVR)은 네모로 표시한다.

도 9는 선택된 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 다양한 HVR 서열 (서열 17-21)을 도시한 것이고, 여기서 각각의 변이체는 MA79b-이식된 "인간화" 항체의 단일 HVR (HVR-L1 (서열 131); HVR-L2 (서열 132); HVR-L3 (서열 133)) 내에서 단일 아미노산 변화를 갖는다. 도시된 단일 아미노산 변화 이외의 가변 경쇄 및 가변 중쇄의 서열은 huMA79b 이식편과 동일하였고 도시하지 않는다. MA79b-이식된 "인간화" 항체의 HVR-H1 (서열 134), HVR-H2 (서열 135) 또는 HVR-H3 (서열 136)에서는 변화가 관찰되지 않았다.

도 10은 huMA79b L2-2 (본원에서 "L2"로도 칭함) 및 huMA79b H3-10 (본원에서 "H3"으로도 칭함)을 포함한 선택된 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 다양한 HVR 서열 (서열 22-106)을 도시한 것이고, 여기서 각각의 변이체는 MA79b-이식된 "인간화" 항체의 단일 HVR 영역 (HVR-L2 (서열 132); HVR-L3 (서열 133); HVR-H1 (서열 134); HVR-H3 (서열 136)의 일부는 도 10에서 서열 107로서 도시된다) 내에서 다수 아미노산 변화를 갖는다. 도시된 아미노산 변화 이외의 가변 경쇄 및 가변 중쇄의 서열은 huMA79b 이식편과 동일하였고 도시하지 않는다. MA79b-이식된 "인간화" 항체의 HVR-L1 (서열 131) 또는 HVR-H2 (서열 135)에서는 변화가 관찰되지 않았다.

도 11은 선택된 항-CD79b 항체, 예를 들어 뮤린 CD79b 항체 ("MA79b"로 표지함), MA79b-이식된 "인간화" 항체 ("huMA79b 이식편"로 표지함), 및 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체, 예를 들어 인간 CD79b의 세포외 도메인 (huCD79b_{ecd}), Fc에 융합된 인간 CD79b의 세포외 도메인 (huCD79b_{ecd}-Fc), 및 MA79b 및 chMA79b에 대한 에피토프를 함유하는 16 아미노산 펩티드 (서열 16)를 포함한 지정된 항원에 대한 huMA79b L2-2 (52R, 53K, 55G, 56R; 서열 22), huMA79b H3-10 (98I, 99R, 100L; 서열 94), huMA79b H1-6 (28P, 30T, 31R, 35N; 서열 57) 및 huMA79b L2/H3 (L2-2 및 H3-10 돌연변이는 아래 설명함)의 Biacore 분석을 도시한 것이다.

도 12는 인간 CD79b의 세포외 도메인 (huCD79b-ecd 항원)에 대한 선택된 항-CD79b 항체, 예를 들어 MA79b-이식된 "인간화" 항체 ("huMA79b 이식편"로 표지함) 및 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 (제1 컬럼에서 1-34 또는 제1 컬럼에서 "모든 프레임워크"로 표지함)의 Biacore 분석을 도시한 것이다. MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체는 잠재적으로 중요한 뮤린 프레임워크 잔기가 존재하는 "모든 프레임워크" 변이체, 및 지정된 바와 같은 가변 경쇄 및 가변 중쇄 내에 HVR 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 프레임워크 돌연변이의 조합을 갖는 변이체 (1-

34로 표지함)를 포함한다. MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 17 (본원에서 "huMA79b.v17"로서 칭함)는 제1 컬럼에서 17로 표지하고, MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 18 (본원에서 "huMA79b.v18"로서 칭함)은 제1 컬럼에서 18로 표지하고, MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 28 (본원에서 "huMA79b.v28"로서 칭함)은 제1 컬럼에서 28로 표지하고, MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 32 (본원에서 "huMA79b.v32"로서 칭함)는 제1 컬럼에서 32로 표지한다. 이가 결합 배수는 특정 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 Kd ("Kd_{변이체}"로 표지함)/키메라 MA79b 항체 (chMA79b)의 Kd ("Kd_{키메라}"로 표지함)로서 표시되고; "이가 결합 배수"로 표시한 컬럼 하의 값은 Kd_{변이체}/Kd_{키메라}를 나타낸다. 검출된 결합이 없음은 도면에서 "NDB"로 지정된다.

도 13a-b (가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크) 및 도 14 (가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크)는 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적인 엑셉터 (acceptor) 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 도시한 것이고, 서열 식별기호는 다음과 같다: (도 13a-b) 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 108), 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 109-111), 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 112), 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 113-115), 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 116), 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 117-119), 인간 VH 엑셉터 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 120), 인간 VH 엑셉터 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 121-122), 인간 VH 엑셉터 2 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 123) 및 인간 VH 엑셉터 2 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 124-26); 및 (도 14) 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 (서열 127), 인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 (서열 128), 인간 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 (서열 129) 및 인간 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 (서열 130).

도 15a (경쇄) 및 15b (중쇄)는 본 발명의 항체 (huMA79b.v17)의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 15a (경쇄) 및 15b (중쇄)는 본 발명의 항체의 한 실시태양 (huMA79b.v17)의 프레임워크 (FR), 추가변 영역 (HVR), 제 1 불변 도메인 (CL 또는 CH1) 및 Fc 영역 (Fc)의 아미노산 서열을 도시한 것이다 (서열 152-159 (도 15a) 및 서열 160-168 (도 15b)). huMA79b.v17의 경쇄 및 중쇄의 전장 아미노산 서열 (가변 및 불변 영역)을 각각 도시하고 (서열 303 (도 15a) 및 서열 304 (도 15b)), 불변 도메인은 밑줄로 표시한다. 가변 도메인의 아미노산 서열을 도시한다 (서열 169 (경쇄에 대해 도 15a) 및 서열 170 (중쇄에 대해 도 15b)).

도 16a (경쇄) 및 16b (중쇄)는 본 발명의 항체 (huMA79b.v18)의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 16a (경쇄) 및 16b (중쇄)는 본 발명의 항체의 한 실시태양 (huMA79b.v18)의 프레임워크 (FR), 추가변 영역 (HVR), 제 1 불변 도메인 (CL 또는 CH1) 및 Fc 영역 (Fc)의 아미노산 서열을 도시한 것이다 (서열 171-178 (도 16a) 및 서열 179-187 (도 16b)). huMA79b.v18의 경쇄 및 중쇄의 전장 아미노산 서열 (가변 및 불변 영역)을 각각 도시하고 (서열 305 (도 16a) 및 306 (도 16b)), 불변 도메인은 밑줄로 표시한다. 가변 도메인의 아미노산 서열을 도시한다 (서열 188 (경쇄에 대해 도 16a) 및 서열 189 (중쇄에 대해 도 16b)).

도 17a (경쇄) 및 17b (중쇄)는 본 발명의 항체 (huMA79b.v28)의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 17a (경쇄) 및 17b (중쇄)는 본 발명의 항체의 한 실시태양 (huMA79b.v28)의 프레임워크 (FR), 추가변 영역 (HVR), 제 1 불변 도메인 (CL 또는 CH1) 및 Fc 영역 (Fc)의 아미노산 서열을 도시한 것이다 (서열 190-197 (도 17a) 및 서열 198-206 (도 17b)). huMA79b.v28의 경쇄 및 중쇄의 전장 아미노산 서열 (가변 및 불변 영역)을 각각 도시하고 (서열 307 (도 17a) 및 308 (도 17b)), 불변 도메인은 밑줄로 표시한다. 가변 도메인의 아미노산 서열을 도시한다 (서열 207 (경쇄에 대해 도 7a-b) 및 서열 208 (중쇄에 대해 도 8a-b)).

도 18a (경쇄) 및 18b (중쇄)는 본 발명의 항체 (huMA79b.v32)의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 18a (경쇄) 및 18b (중쇄)는 본 발명의 항체의 한 실시태양 (huMA79b.v32)의 프레임워크 (FR), 추가변 영역 (HVR), 제 1 불변 도메인 (CL 또는 CH1) 및 Fc 영역 (Fc)의 아미노산 서열을 도시한 것이다 (서열 209-216 (도 18a) 및 서열 217-225 (도 18b)). huMA79b.v32의 경쇄 및 중쇄의 전장 아미노산 서열 (가변 및 불변 영역)을 각각 도시하고 (서열 309 (도 18a) 및 310 (도 18b)), 불변 도메인은 밑줄로 표시한다. 가변 도메인의 아미노산 서열을 도시한다 (서열 226 (경쇄에 대해 도 18a) 및 서열 227 (중쇄에 대해 도 18b)).

도 19는 인간 (서열 2), 사이노몰거스 원숭이 (cyno) (서열 7) 및 마우스 (서열 8)로부터의 CD79b의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 것이다. 인간 및 cyno-CD79b는 85%의 아미노산 동일성을 갖는다. 신호 서열, 시험 펩티드 (실시에 1에 기재된 MA79b, chMA79b 및 항-cyno CD79b 항체에 대한 11 아미노산 에피토프; ARSEDYRNPK (서열 12)), 막횡단 (TM) 도메인 및 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM) 도메인을 나타낸다. 네모로 표

시한 영역은 CD79b의 스플라이스 변이체 (실시에 1에 기재된) 내에 부재하는 CD79b의 영역이다.

도 20은 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 항-CD79b 항체를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, BJAB-루시페라제 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다 ((a) chMA79b-SMCC-DM1 (약물 로드 (drug load)는 약 2.9임 (표 9)), (b) huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 (약물 로드는 약 2.4임 (표 9)). 대조군은 Herceptin® (트라스투주맵)-SMCC-DM1 (항-HER2-SMCC-DM1)을 포함하였다.

도 21a는 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 항-CD79b 항체를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, Granta-519 (인간 외투층 세포 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다 ((a) chMA79b-SMCC-DM1 (약물 로드는 약 3.6임 (표 10)), (b) huMA79b.v17-SMCC-DM1 (약물 로드는 약 3.4임 (표 10)), (c) huMA79b.v28-SMCC-DM1 (약물 로드는 약 3.3 또는 3.4임 (표 10)), (d) huMA79b.v18-SMCC-DM1 (약물 로드는 약 3.4임 (표 10)), 및 (e) huMA79b.v32-SMCC-DM1 (약물 로드는 약 2.9임 (표 10))). 대조군은 Herceptin® (트라스투주맵)-SMCC-DM1 (항-HER2-SMCC-DM1)을 포함하였다. 도 21b는 연구의 처음 7일 동안 체중의 유의한 변화가 없었음을 보여주는, Granta-519 이종이식편 연구 (도 21a 및 표 10)로부터의 마우스에서 체중 변화 비율 (%)의 플롯이다. "hu"는 인간화 항체를 나타내고, "ch"는 키메라 항체를 나타낸다.

도 22는 약물 모이어티가 경쇄 (LC-ADC); 중쇄 (HC-ADC); 및 Fc 영역 (Fc-ADC) 내에서 조작된 시스테인기에 부착되는, 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 약물 접합체 (ADC)의 도면이다.

도 23은 (i) 환원제 TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염)을 사용하여 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 (ThioMab) 내에서 시스테인 디설피드 부가물 및 사슬간 및 사슬내 디설피드를 환원시키고; (ii) dhAA (데히드로아스코르브산)을 사용하여 부분적으로 산화, 즉, 재산화시켜 사슬간 및 사슬내 디설피드를 재형성하고; 및 (iii) 재산화된 항체를 약물-링커 중간체와 접합시켜 시스테인 항-CD79b 약물 접합체 (ADC)를 형성하는 단계를 도시한 것이다.

도 24는 인간화 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 (thio-huMA79b.v17-HC-A118C)의 (A) 경쇄 서열 (서열 229) 및 (B) 중쇄 서열 (서열 228)을 도시한 것이고, 여기서 중쇄의 EU 위치 118의 알라닌 (순차적 위치 알라닌 118; 카바트 위치 114)이 시스테인으로 변경되었다. 약물 모이어티는 중쇄 내의 조작된 시스테인기에 부착될 수 있다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다. Fc 영역은 이탤릭체로 표시한다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 25는 인간화 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 (thio-huMA79b.v18-HC-A118C)의 (A) 경쇄 서열 (서열 231) 및 (B) 중쇄 서열 (서열 230)을 도시한 것이고, 여기서 중쇄의 EU 위치 118의 알라닌 (순차적 위치 알라닌 118; 카바트 위치 114)이 시스테인으로 변경되었다. 약물 모이어티는 중쇄 내의 조작된 시스테인기에 부착될 수 있다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다. Fc 영역은 이탤릭체로 표시한다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 26은 인간화 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 (thio-huMA79b.v28-HC-A118C)의 (A) 경쇄 서열 (서열 233) 및 (B) 중쇄 서열 (서열 232)을 도시한 것이고, 여기서 중쇄의 EU 위치 118의 알라닌 (순차적 위치 알라닌 118; 카바트 위치 114)이 시스테인으로 변경되었다. 약물 모이어티는 중쇄 내의 조작된 시스테인기에 부착될 수 있다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다. Fc 영역은 이탤릭체로 표시한다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 27은 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 (thio-MA79b-LC-V205C)의 (A) 경쇄 서열 (서열 235) 및 (B) 중쇄 서열 (서열 234)을 도시한 것이고, 여기서 경쇄의 카바트 위치 205의 발린 (순차적 위치 발린 209)이 시스테인으로 변경되었다. 약물 모이어티는 경쇄 내의 조작된 시스테인기에 부착될 수 있다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다. Fc 영역은 이탤릭체로 표시한다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타낸다.

도 28은 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 (thio-MA79b-HC-A118C)의 (A) 경쇄 서열 (서열 237) 및 (B) 중쇄 서열 (서열 236)을 도시한 것이고, 여기서 중쇄의 EU 위치 118의 알라닌 (순차적 위치 알라닌 118; 카바트 위치 114)이 시스테인으로 변경되었다. 약물 모이어티는 중쇄 내의 조작된 시스테인기에 부착될 수 있다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변

영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다. Fc 영역은 이탤릭체로 표시된다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타낸다.

도 29a-b는 BJAB-루시퍼라제 세포의 표면 상에 발현된 CD79b에 대한 본 발명의 항-CD79b thioMAb 약물 접합체 (TDC)의 결합이, MMAF와 접합된 chMA79b의 (A) LC (V205C) thioMAb 변이체 및 (B) HC (A118C) thioMAb 변이체에 대한 것과 유사함을 나타내는 FACS 플롯이다. 검출에는 MS 항-인간IgG-PE를 사용하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타낸다.

도 30a-d는 BJAB-루시퍼라제 세포의 표면 상에 발현된 CD79b에 대한 본 발명의 항-CD79b thioMAb 약물 접합체 (TDC)의 결합이, huMA79b.v18의 (A) 네이키드 (naked) (접합되지 않은) HC (A118C) thioMAb 변이체, 및 제시된 상이한 약물 접합체와 접합된 huMA79b.v18의 HC (A118C) thioMAb 변이체 ((B) MMAF, (C) MMAE 및 (D) DM1))에 대한 것과 유사함을 나타내는 FACS 플롯이다. 검출에는 MS 항-인간IgG-PE를 사용하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 31a-d는 BJAB-루시퍼라제 세포의 표면 상에 발현된 CD79b에 대한 본 발명의 항-CD79b thioMAb 약물 접합체 (TDC)의 결합이, huMA79b.v28의 (A) 네이키드 (접합되지 않은) HC (A118C) thioMAb 변이체, 및 제시된 상이한 약물 접합체와 접합된 huMA79b.v28의 HC (A118C) thioMAb 변이체 ((B) MMAE, (C) DM1 및 (D) MMAF))에 대한 것과 유사함을 나타내는 FACS 플롯이다. 검출에는 MS 항-인간-PE를 사용하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 32a-d는 cynoCD79b를 발현하는 BJAB-세포의 표면 상에 발현된 CD79b에 대한 본 발명의 항-cynoCD79b thioMAb 약물 접합체 (TDC)의 결합이, 항-cynoCD79b (ch10D10)의 (A) 네이키드 (접합되지 않은) HC(A118C) thioMAb 변이체, 및 제시된 상이한 약물 접합체와 접합된 항-cynoCD79b (ch10D10)의 HC(A118C) thioMAb 변이체 ((B) MMAE, (C) DM1 및 (D) MMAF))에 대한 것과 유사함을 나타내는 FACS 플롯이다. 검출에는 MS 항-huIgG-PE를 사용하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타낸다.

도 33a는 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 조작된 시스테인의 위치 (LC (V205C) 또는 HC (A118C))가 상이하고/하거나 상이한 약물 투여량의 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, Granta-519 (인간 외투층 세포 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.9임 (표 11)) 또는 thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.8임 (표 11))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 hu-항-HER2-MC-MMAF 및 thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF 및 chMA79b-MC-MMAF를 포함하였다. 도 33b는 연구의 처음 14일 동안 체중의 유의한 변화가 없었음을 보여주는, Granta-519 이종이식편 연구 (도 33a 및 표 11)로부터의 마우스에서 체중 변화 비율 (%)의 플롯이다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 34a는 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 또는 MC-MMAF)에 접합된 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, BJAB-루시퍼라제 (버키트 (Burkitt) 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.87임 (표 12)), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 12)), 또는 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.95임 (표 12))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28 대조군 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)) 및 항-CD22 대조군 (thio hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF)을 포함하였다. 도 34b는 연구의 처음 7일 동안 체중의 유의한 변화가 없었음을 보여주는, BJAB-루시퍼라제 이종이식편 연구 (도 34a 및 표 12)로부터의 마우스에서 체중 변화 비율 (%)의 플롯이다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 35a는 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 또는 MC-MMAF)에 접합된 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, WSU-DLCL2 (미만성 대세포 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.87임 (표 13)), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 13)), 또는 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.95임 (표 13))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE),

huMA79b.v28 대조군 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)) 및 항-CD22 대조군 (thio hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF)을 포함하였다. 도 35b는 연구의 처음 7일 동안 체중의 유의한 변화가 없었음을 보여주는, WSU-DLCL2 이종이식편 연구 (도 35a 및 표 13)로부터의 마우스에서 체중 변화 비율 (%)의 플롯이다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 36은 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (BMPEO-DM1, MC-MMAF 또는 MCvcPAB-MMAE)에 접합된 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, DOHH2 (여포성 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 14)), thio huMA79b.v28-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.95임 (표 14)) 또는 thio huMA79b-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.87임 (표 14))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28 대조군 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)) 및 항-CD22 대조군 (thio hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF)을 포함하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 37은 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 또는 MC-MMAF)에 접합되고/되거나 제시된 바와 같은 상이한 투여량으로 투여되는 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, BJAB-루시퍼라제 (버키트 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 15)), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.9임 (표 15)), 또는 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.9임 (표 15))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 비히클 (버퍼 단독), 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28 대조군 (thio huMA79b.v28-HC(A118C)) 및 항-CD22 대조군 (thio hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF)을 포함하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 38a는 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (BMPEO-DM1 또는 MC-MMAF)에 접합되고/되거나 제시된 바와 같은 상이한 투여량으로 투여되는 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, Granta-619 (인간 외투층 세포 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 16)), 또는 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.95임 (표 16))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF)을 포함하였다. 도 38b는 연구의 처음 14일 동안 체중의 유의한 변화가 없었음을 보여주는, Granta-519 이종이식편 연구 (도 38a 및 표 16)로부터의 마우스에서 체중 변화 비율 (%)의 플롯이다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 39는 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (BMPEO-DM1, MC-MMAF 또는 MCvcPAB-MMAE)에 접합되고/되거나 제시된 바와 같은 상이한 투여량으로 투여되는 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, WSU-DLCL2 (미만성 대세포 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 17)), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.9임 (표 17)) 또는 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.9임 (표 17))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 비히클 (버퍼 단독) 및 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE)을 포함하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 40은 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (BMPEO-DM1 또는 MCvcPAB-MMAE)에 접합되고/되거나 제시된 바와 같은 상이한 투여량으로 투여되는 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, Granta-519 (인간 외투층 세포 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 18)) 또는 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.87임 (표 18))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE)을 포함하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는

인간화 항체를 나타낸다.

도 41은 (1) 대조군 thio hu 항-gD-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (2.0 MMAE/Ab 로딩), (2) 대조군 thio hu 항-gD-HC(A118C)-MC-MMAF (2.1 MMAF/Ab 로딩), (3) 대조군 thio hu 항-gD-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (2.1 DM1/Ab 로딩), (4) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF (1.91 MMAF/Ab 로딩), (5) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (1.8 DM1/Ab 로딩), 및 (6) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (2.0 MMAE/Ab 로딩)를 포함한, 변하는 농도 0.001 내지 10000 ng의 TDC/ml로 처리한 (A) BJAB, (B) Granta-519 또는 (C) WSU-DLCL2 종양 세포를 사용하는 시험관내 세포 증식 분석 결과의 플롯을 도시한 것이다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다. "gD"는 당단백질 D를 나타낸다.

도 42는 PR0283627 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 (서열 238)을 도시한 것이고, 여기서 서열 235는 "DNA548455" (본원에서 "cyno CD79b"로서도 언급됨)로 지정된 클론이다. 뉴클레오타이드 서열은 사이노몰거스 CD79b를 코딩하고, 여기서 출발 및 정지 코돈은 굵은 글씨체로 밑줄로 표시한다.

도 43은 도 42에 제시된 서열 235의 코딩 서열로부터 유래된 아미노산 서열 (서열 239)을 도시한 것이다.

도 44는 항-cyno CD79b 항체 (ch10D10)의 경쇄의 뉴클레오타이드 서열 (서열 240)을 도시한 것이다. 뉴클레오타이드 서열은 항-cyno CD79b 항체 (ch10D10)의 경쇄를 코딩하고, 여기서 출발 및 정지 코돈은 굵은 글씨체로 밑줄로 표시한다.

도 45는 도 44에 제시된 서열 240의 코딩 서열로부터 유래된, 처음 18개 아미노산 신호 서열이 빠진 아미노산 서열 (서열 241)을 도시한 것이다. 가변 영역 (서열 302)은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다.

도 46은 항-cyno CD79b 항체 (ch10D10)의 중쇄의 뉴클레오타이드 서열 (서열 242)을 도시한 것이다. 뉴클레오타이드 서열은 항-cyno CD79b 항체 (ch10D10)의 중쇄를 코딩하고, 여기서 출발 및 정지 코돈은 굵은 글씨체로 밑줄로 표시한다.

도 47은 도 46에 제시된 서열 242의 코딩 서열로부터 유래된, 처음 18개 아미노산의 신호 서열과 정지 코돈 앞의 마지막 리신 (K)이 빠진 아미노산 서열 (서열 243)을 도시한 것이다. 가변 영역 (서열 301)은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다.

도 48은 시스테인 조작된 항-cyno CD79b 항체 (Thio-항-cynoCD79b-HC-A118C)의 (A) 경쇄 서열 (서열 245) 및 (B) 중쇄 서열 (서열 244)을 도시한 것이고, 여기서 중쇄의 EU 위치 118의 알라닌 (순차적 위치 알라닌 118; 카바트 위치 114)이 시스테인으로 변경되었다. 중쇄의 EU 위치 6의 아미노산 D (도면에서 음영)는 별법으로 E일 수 있다. 약물 모이어티는 중쇄 내의 조작된 시스테인기에 부착될 수 있다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다. Fc 영역은 이탤릭체로 표시한다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타낸다.

도 49는 시스테인 조작된 항-cyno CD79b 항체 (Thio-항-cynoCD79b-LC-V205C)의 (A) 경쇄 서열 (서열 300) 및 (B) 중쇄 서열 (서열 299)을 도시한 것이고, 여기서 경쇄의 카바트 위치 205의 발린 (순차적 위치 발린 209)이 시스테인으로 변경되었다. 중쇄의 EU 위치 6의 아미노산 D (도면에서 음영)은 별법으로 E일 수 있다. 약물 모이어티는 중쇄 내의 조작된 시스테인기에 부착될 수 있다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않은 영역이다. Fc 영역은 이탤릭체로 표시된다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타낸다.

도 50은 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 상이한 링커 약물 모이어티 (BMPEO-DM1, MC-MMAF 또는 MCvcPAB-MMAE)에 접합된 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, BJAB-cynoCD79b (cynoCD79b를 발현하는 BJAB 세포) (버킷트 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 19)), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.9임 (표 19)), 또는 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.9임 (표 19)), thio 항-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.8임 (표 19)), thio 항-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF (약물 로드는 약 1.9임 (표 19)) 또는 thio 항-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (약물 로드는 약 1.86임 (표 19))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF)을 포함하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

도 51은 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 제시된 바와 같은 상이한 투여량으로 투여되는 BMPEO-DM1 링커 약물 모이어티를 갖는 항-CD79b TDC를 투여하면 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 보여주는, BJAB-cynoCD79b (cynoCD79b를 발현하는 BJAB 세포) (버킷 림프종) 이종이식편 모델에서 생체내 종양 성장 억제의 그래프이다. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.85임 (표 20)) 또는 thio 항-cyno(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (약물 로드는 약 1.8임 (표 20))로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 성장의 유의한 억제를 보였다. 대조군은 항-HER2 대조군 (thio hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1) 및 huMA79b.v28 대조군 (thio huMA79b.v28-HC(A118C) 및 항-cynoCD79b(ch10D10) 대조군 (thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C))을 포함하였다. "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 본 발명은 포유동물에서 조혈계 종양의 치료에 유용한 조성물을 확인하기 위한 방법, 조성물, 키트 및 제품 및 조혈계 종양의 치료를 위한 상기 조성물의 사용 방법을 제공한다.

[0070] 상기 방법, 조성물, 키트 및 제품에 대한 상세한 설명을 본원에서 제공한다.

[0071] I. 일반적인 기술

[0072] 본 발명의 실시에서는 달리 지시하지 않으면 당업계의 기술 범위 내에 있는 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 그러한 기술은 문헌 ([Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (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 et al., eds. 1987, 및 주기적인 업데이트)]; [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)]과 같은 문헌에 충분히 설명되어 있다.

[0073] II. 정의

[0074] 본원 명세서의 설명을 위해, 다음 정의가 적용될 것이고, 적절한 경우마다 단수로 사용되는 용어는 복수를 포함하고 그 반대도 성립할 것이다. 기술된 임의의 정의가 참조로 포함되는 임의의 문서와 충돌할 경우에는, 아래에서 기술된 정의가 적용될 것이다.

[0075] 본원에서 "B-세포 표면 마커" 또는 "B-세포 표면 항원"은 그에 대해 결합하는 길항제, 예를 들어 천연 발생 B-세포 항원에 대한 리간드의 결합을 길항할 수 있는, B-세포 표면 항원 또는 가용성 형태의 B-세포 표면 항원에 대한 항체 (이로 제한되지 않음)로 표적화될 수 있는, B 세포의 표면 상에 발현되는 항원이다. 예시적인 B-세포 표면 마커는 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 및 CD86 백혈구 표면 마커를 포함한다 (이에 대한 설명은 문헌 [The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York]을 참고). 다른 B-세포 표면 마커는 RP105, FcRH2, B-세포 CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, BtIG, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, 및 239287을 포함한다. 특히 목적하는 B-세포 표면 마커는 포유동물의 다른 비-B-세포 조직에 비해 B 세포 상에 우선적으로 발현되고, 전구체 B 세포와 성숙 B 세포 모두 상에 발현될 수 있다.

[0076] 본원에서 사용되는 용어 "CD79b"는 달리 나타내지 않으면 포유동물, 예를 들어 영장류 (예를 들어 인간, 사이노물거스 원숭이 (cyno)) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 CD79b를 의미한다. 인간 CD79b는 또한 본원에서 "PRO36249" (서열 2)로서 언급되고, 본원에서 "DNA225786"으로도 언급되는 뉴클레오티드 서열 (서열 1)에 의해 코딩된다. 또한, 사이노물거스 CD79b는 본원에서 "cyno CD79b" 또는 "PRO283627" (서열 239)로서 언급되고, 본원에서 "DNA548455"로도 언급되는 뉴클레오티드 서열 (서열 238)에 의해 코딩된다. 용어 "CD79b"는 비처리된 "전장" CD79b 및 세포 내에서의 처리에 의해 생성된 임의의 형태의 CD79b를 포함한다. 또한, 상기 용어는 CD79b의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체, 대립유전자 변이체, 및 이소형을 포함한다. 본원에서 설명되는 CD79b 폴리펩티드는 다양한 공급원, 예를 들어 인간 조직 종류 또는 다른 공급원으로부터 분리되거나, 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다.

"천연 서열 CD79b 폴리펩티드"는 자연으로부터 유래된 대응하는 CD79b 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 그러한 천연 서열 CD79b 폴리펩티드는 자연에서 단리될 수 있거나 재조합 또는 합성 수단에 의해 제조될 수 있다. 용어 "천연 서열 CD79b 폴리펩티드"는 구체적으로 특정 CD79b 폴리펩티드의 천연 발생하는 말단 절단 (truncated) 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 선택적 스플라이싱된 형태) 및 폴리펩티드의 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 특정 실시태양에서, 본원에 개시되는 천연 서열 CD79b 폴리펩티드는 첨부 도면에 제시된 전장 아미노산 서열을 포함하는 성숙 또는 전장 천연 서열 폴리펩티드이다. 출발 및 정지 코돈 (표시될 경우)은 도면에서 굵은 글씨체로 밑줄로 나타낸다. 첨부 도면에서 "N"으로 표시된 핵산 잔기는 임의의 핵산 잔기이다. 그러나, 첨부 도면에 개시된 CD79b 폴리펩티드는 도면에서 아미노산 위치 1로서 본원에서 지정된 메티오닌 잔기로 시작하는 것으로 제시되지만, 도면에서 아미노산 위치 1의 상류 또는 하류에 위치하는 다른 메티오닌 잔기가 CD79b 폴리펩티드의 출발 아미노산 잔기로서 사용될 수 있다고 생각할 수 있고, 또한 가능하다.

[0077] "MA79b" 또는 "뮤린 CD79b 항체" 또는 "뮤린 항-CD79b 항체"는 서열 10의 경쇄 가변 도메인 (도 7a-b) 및 서열 14의 중쇄 가변 도메인 (도 8a-b)을 포함하는 뮤린 항-CD79b 모노클로날 항체를 구체적으로 나타내고자 본원에서 사용된다. 뮤린 항-CD79b 모노클로날 항체는 시판 회사, 예를 들어 바이오메다 (Biomed) (항-인간 CD79b 항체; 미국 캘리포니아주 포스터 시티), 비디바이오사이언스 (BDbioscience) (항-인간 CD79b 항체; 미국 캘리포니아주 샌디에고) 또는 안셀 (Ansell) (항-인간 CD79b 항체; 미국 미네소타주 베이포트)로부터 구입할 수 있거나, 1993년 7월 20일자로 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (ATCC; 미국 버지니아주 매나사스)에 ATCC 기탁 번호 HB11413으로 기탁된 하이브리도마 클론 3A2-2E7로부터 생성될 수 있다.

[0078] "chMA79b" 또는 "키메라 MA79b 항체"는 본원에서 서열 4의 경쇄 (도 4)를 포함하는 키메라 항-인간 CD79b 항체 (2006년 8월 3일 출원된 미국 특허 출원 11/462,336에 기재됨)를 구체적으로 나타내기 위해 사용된다. 서열 4의 경쇄는 서열 10의 가변 도메인 (도 7a-b) 및 인간 IgG1의 경쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 키메라 항-CD79b 항체는 서열 6의 중쇄 (도 6)를 추가로 포함한다. 서열 6의 중쇄는 서열 14의 가변 도메인 (도 8a-b) 및 인간 IgG1의 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다.

[0079] "항-cynoCD79b" 또는 "항-cyno CD79b"는 본원에서 cyno CD79b (도 43의 서열 239)에 결합하는 항체 (2006년 8월 3일 출원된 미국 특허 출원 11/462,336에 기재됨)를 나타내기 위해 사용된다. "항-cynoCD79b(ch10D10)" 또는 "ch10D10"은 cynoCD79b (도 43의 서열 239)에 결합하는 키메라 항-cynoCD79b (2006년 8월 3일 출원된 미국 특허 출원 11/462,336에 기재됨)를 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 항-cynoCD79b(ch10D10) 또는 ch10D10은 서열 241의 경쇄 (도 45)를 포함하는 키메라 항-cynoCD79b 항체이다. 항-cynoCD79b(ch10D10) 또는 ch10D10은 서열 243의 중쇄를 추가로 포함한다 (도 47).

[0080] "MA79b-이식편" 또는 "MA79b-이식된 '인간화' 항체" 또는 "huMA79b 이식편"는 뮤린 항-CD79b 항체 (MA79b)의 초가변 영역을 R71A, N73T 및 L78A가 존재하는 억제제 인간 컨센서스 VL 카파 I (huKI) 및 인간 하위군 III 컨센서스 VH (huIII) 내로 이식시켜 생성된 이식편을 구체적으로 나타내기 위해 본원에서 사용된다 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)) (실시예 1A 및 도 7 (서열 11) 및 8 (서열 15) 참조).

[0081] 아미노산 잔기/위치의 "변형"은 본원에서 사용될 때 출발 아미노산 서열에 비해 1차 아미노산 서열의 변화를 의미하고, 여기서 변화는 상기 아미노산 잔기/위치를 포함하는 서열 변경으로부터 발생한다. 예를 들어, 전형적인 변형은 잔기의 (또는 상기 위치에서) 다른 아미노산으로의 치환 (예를 들어, 보존적 또는 비-보존적 치환), 상기 잔기/위치에 인접한 하나 이상의 (일반적으로 5 또는 3개 미만) 아미노산의 삽입, 및 상기 잔기/위치의 결실을 포함한다. "아미노산 치환", 또는 그의 변이는 소정의 (출발) 아미노산 서열 내의 존재하는 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 교체하는 것을 의미한다. 일반적으로, 변형은 바람직하게는 출발 (또는 "야생형") 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 변이체 폴리펩티드의 적어도 하나의 물리생화학적 활성을 변경시킨다. 예를 들어, 항체의 경우에, 변경되는 물리생화학적 활성은 표적 분자에 대한 결합 친화도, 결합능 및/또는 결합 효과일 수 있다.

[0082] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 사용되고, 예를 들어 단일 항-CD79b 모노클로날 항체 (작용제, 길항제, 중화항체, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체 포함), 다중 에피토프 특이성을 갖는 항-CD79b 항체 조성물, 폴리클로날 항체, 다가 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 이중특이적 항체), 단일쇄 항-CD79b 항체, 및 항-CD79b 항체의 단편 (아래 참조), 예를 들어 목적하는 생물학적 또는 면역학적 활성을 보이는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편, 디아바디, 단일 도메인 항체 (sdAb)를 구체적으로 포함한다. 용어 "면역글로불린" (Ig)은 본원에서 항체와 상호 교환가능하게 사용된다.

항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙된 항체일 수 있다.

- [0083] 용어 "항-CD79b 항체" 또는 "CD79b에 결합하는 항체"는 CD79b를 표적으로 할 때 항체가 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 CD79b에 결합할 수 있는 항체를 나타낸다. 바람직하게는, 관련되지 않는 비-CD79b 단백질에 대한 항-CD79b 항체의 결합 정도는 예를 들어 방사면역분석법 (RIA)으로 측정시에 CD79b에 대한 항체 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시태양에서, CD79b에 결합하는 항체의 해리 상수 (K_d)는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 이다. 특정 실시태양에서, 항-CD79b 항체는 상이한 종으로부터의 CD79b 사이에서 보존된 CD79b의 에피토프에 결합한다.
- [0084] "단리된 항체"는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체의 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정시에 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과, 수준까지, (2) 스피닝 컵 (spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 제조할 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0085] 기본 4쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이중4량체 당단백질이다 (IgM 항체는 J 사슬로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이중4량체 단위로 이루어지고, 따라서 10개의 항원 결합 부위를 포함하는 한편, 분비형 IgA 항체는 중합되어, J 사슬과 함께 2-5개의 기본 4쇄 단위를 포함하는 다량체를 형성할 수 있다). IgG의 경우에, 4쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 사슬은 하나의 공유 디설피드 결합에 의해 H 사슬에 연결되는 한편, 2개의 H 사슬은 H 사슬 이소형에 따라 하나 이상의 디설피드 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 사슬은 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 디설피드 다리를 갖는다. 각각의 H 사슬은 N-말단에서 가변 도메인 (V_H)을 갖고, 이어서 각각 α 및 γ 사슬에 대해 3개의 불변 도메인 (C_H) 및 μ 및 ϵ 이소형에 대해 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각각의 L 사슬은 N-말단에서 가변 도메인 (V_L)을 갖고, 이어서, 그의 다른 단부에서 불변 도메인 (C_L)을 갖는다. V_L 은 V_H 와 정렬되고, C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 생각된다. V_H 및 V_L 의 페어링은 함께 단일 항원 결합 부위를 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는 예를 들어 문헌 [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]을 참조한다.
- [0086] 임의의 척추동물종의 L 사슬은 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파 및 람다로 불리는 2개의 분명하게 구분되는 종류 중 하나로 지정될 수 있다. 그들의 중쇄 (C_H)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스 또는 이소형으로 지정될 수 있다. 5가지 클래스의 면역글로불린, 즉, 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 칭하는 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재한다. γ 및 α 클래스는 C_H 서열 및 기능에서 비교적 작은 차이에 기초하여 서브클래스로 추가로 나누어지고, 예를 들어 인간은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2의 서브클래스를 발현한다.
- [0087] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 나타낸다. 중쇄의 가변 도메인은 " V_H "로 언급될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 " V_L "로 언급될 수 있다. 상기 도메인은 일반적으로 항체의 최대 가변 부분이고, 항원 결합 부위를 함유한다.
- [0088] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 세그먼트가 항체들 사이에서 서열이 크게 상이함을 나타낸다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110개 아미노산 범위 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신에, V 영역은 각각 9-12개 아미노산 길이의 "초가변 영역"으로 불리는 가변성이 매우 높은 보다 짧은 영역에 의해 분리되는 15-30개 아미노산의 프레임 워크 영역 (FR)으로 불리는 비교적 가변성이 낮은 스트레치로 구성된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 루프 연결부를 형성하고 일부 경우에 β -시트 입체형태의 일부를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 주로 β -시트 입체형태를 취하는 4개의 FR 영역을 각각 포함한다. 각 사슬 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬의 초가변 영역과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 ([Kabat

et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만, 다양한 효과기 기능, 예를 들어 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0089] "무손상" 항체는 항원 결합 부위 및 C_L 및 적어도 중쇄 불변 도메인, C_H1 , C_H2 및 C_H3 을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가질 수 있다.

[0090] 본 발명의 목적을 위해 "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성 표지에 접합되지 않은 항체이다.

[0091] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (미국 특허 5,641,870의 실시예 2; [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다. 한 실시태양에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하고, 따라서 항원에 결합하는 능력을 보유한다.

[0092] 항체를 파파인으로 소화시키면 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (이 명칭은 쉽게 결정화하는 그의 능력을 반영한다)을 생성시킨다. Fab 단편은 H 사슬의 가변 영역 도메인 (V_H), 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1)과 함께 전체 L 사슬로 이루어진다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합에 관하여 일가이고, 즉, 하나의 항원 결합 부위를 갖는다. 항체를 펩신으로 처리하면, 이가 항원 결합 활성을 갖는 2개의 디설피드 연결된 Fab 단편에 대략적으로 대응하고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 하나의 큰 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_H1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 잔기가 추가된다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 한쌍의 Fab' 단편으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학 커플링도 당업계에 공지되어 있다.

[0093] Fc 단편은 디설피드에 의해 함께 유지되는 두 H 사슬의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 효과기 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 종류의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식된다.

[0094] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 상기 단편은 강한 비공유 회합 상태의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv (scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 이중쇄 Fv 종에 유사한 "이량체성" 구조로 회합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 연결될 수 있다. 이들 2개의 도메인의 폴딩은 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여하는 6개의 초가변 루프 (각각 H 및 L 사슬로부터 3개의 루프)를 생성시킨다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)이라도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0095] "단일쇄 Fv" (또한 "sFv" 또는 "scFv"로 약칭함)는 단일 폴리펩티드 사슬 내로 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv에 관해서는 문헌 [Plueckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; 및 [Borrebaeck 1995, 하기 문헌]을 참조한다.

[0096] 용어 "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편을 나타내고, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (V_H - V_L) 내의 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 작은 항체 단편은 V 도메인의 사슬 내가 아니라 사슬간 페어링이 달성되어 이가 단편, 즉, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 단편을 생성하도록, V_H 및 V_L 도메인 사이에 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)를 갖는 sFv 단편 (상기 단락 참조)을 구성함으로써 제조된다. 디아바디는 이가 또는 이중특이적일 수 있다. 이중특이적 디아바디는 2개의 "교차 (crossover)" sFv 단편의 이중이량체이고, 여기서 2개의 항체의 V_H 및 V_L 도메인은 상이한 폴리펩티드 사슬 상에 존재한다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003)] 및

[Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 설명되어 있다. 트리 아바디 및 테트라바디도 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0097]

본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 의미한다. 즉, 이 집단을 구성하는 개개의 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 작용하여 특이성이 높다. 또한, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제에 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 그의 특이성에 추가로, 모노클로날 항체는 합성되고, 다른 항체에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에서 유용한 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567 참조). "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0098]

모노클로날 항체는 본원에서 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 사슬(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 4,816,567; [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)] 참조). 본원에서 관심있는 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래한 가변 도메인 항원 결합 서열, 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 영장류화 (primitized) 항체를 포함한다.

[0099]

비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 항체에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우에, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린 (수여 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수여 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 보다 개선하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 면역글로불린의 초가변 루프에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR에 대응한다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 ([Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)])을 참조한다. 또한, 예를 들어, 문헌 ([Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma and Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)] 및 여기에 인용된 참조문헌을 참조한다.

[0100]

항체를 나타내기 위해 본원에서 사용될 때 "Thio"는 시스테인-조작된 항체를 나타내는 한편, 항체를 나타내기 위해 본원에서 사용될 때 "hu"는 인간화 항체를 나타낸다.

[0101]

"인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/되거나 본원에 개시되는 임의의 인간 항체 제조 기술을 사용하여 제조된 항체에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 상기 인간 항체의 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 특히 배제한다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하여 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다 ([Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]). 또한, 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법을 이용할 수 있다. 또한, 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는, 항원 시험 접종에 반응하여 항체를 생산하도록 변형되었지만 그의 내인성 로커스가 기능하지 않는 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역처리된 제노마우스 (xenomouse)에 항원을 투여하여 만들어질 수 있다 (예를 들어, XENOMOUSE™ 기술에 대해서는 미국 특허 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 대해서는,

예를 들어 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0102]

용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 본원에서 사용될 때 서열에서 초가변이고/이거나 구조상 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역; 즉, VH 내에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 많은 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 변동성에 기초하고, 가장 흔히 사용된다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 코티아 (Chothia)는 그 대신 구조 루프의 위치를 나타낸다 (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). 카바트 넘버링 방식을 사용하여 넘버링할 때 코티아 CDR-H1 루프의 말단은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 변한다 (이것은 카바트 넘버링 방식이 H35A 및 H35B에 삽입을 두기 때문이고; 35A 및 35B가 존재하지 않을 경우, 루프는 32에서 끝나고; 35A만이 존재할 경우에는 루프가 33에서 끝나고; 35A와 35B가 모두 존재할 경우 루프는 34에서 끝난다). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 코티아 구조 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 상기 초가변 영역의 잔기를 아래에 나타낸다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
----	-----	---	-----	-----
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
(카바트 넘버링)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(코티아 넘버링)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0103]

[0104]

초가변 영역은 다음과 같이 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에서 26-35B (H1), 50-65, 47-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0105]

"프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정되는 초가변 영역 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.

[0106]

용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 그의 변형은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서 항체 편집 (compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 상기 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 그 내부에 대한 삽입에 대응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬시킴으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0107]

카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)을 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 색인 (index)"은 일반적으로 면역글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 카바트 등의 상기 문헌에 보고된 EU 색인 참조). "카바트에서와 같은 EU 색인"은 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않으면, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은

카바트 넘버링 시스템에 의해 넘버링된 잔기를 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않으면, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다 (예를 들어, 미국 특허 가출원 60/640,323, EU 넘버링에 대한 도면 참조).

[0108] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 그의 하나 이상의 HVR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에서 공지된 과정에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙을 설명하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이가 유발은 문헌 ([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)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.

[0109] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 바람직한 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0110] 본원에서 사용되는 "작용제 항체"는 목적하는 폴리펩티드의 기능적 활성의 적어도 하나를 모방하는 항체이다.

[0111] "중 의존성 항체", 예를 들어 포유동물 항-인간 IgE 항체는 제2 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 것보다 더 큰, 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 결합 친화도를 갖는 항체이다. 보통, 중 의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합하지만" (즉, 결합 친화도 (Kd) 값이 약 1×10^{-7} M 이하, 바람직하게는 약 1×10^{-8} M 이하, 가장 바람직하게는 약 1×10^{-9} M 이하이지만), 제2 비-인간 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도는 인간 항원에 대한 그의 결합 친화도보다 적어도 약 50배, 또는 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 더 작다. 중 의존성 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 종류의 항체일 수 있지만, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0112] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합을 나타낸다. 달리 나타내지 않으면, 본원에서 사용될 때 "결합 친화도"는 결합쌍의 멤버 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)에 의해 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함하여 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 측정할 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로 항원에 보다 빠르게 결합하고 보다 오래 결합된 상태로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 임의의 방법이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시태양을 아래에 설명한다.

[0113] 결합 친화도를 나타내기 위해 본원에서 사용될 때, "또는 이보다 우수한"은 분자와 그의 결합 파트너 사이의 보다 강한 결합을 의미한다. 본원에서 사용될 때, "또는 이보다 우수한"은 보다 작은 Kd 값으로 제시되는, 보다 강한 결합을 의미한다. 예를 들어, 항원에 대한 친화도가 "0.6 nM이거나 또는 이보다 우수한" 항체에서, 항체의 항원에 대한 친화도는 <0.6 nM, 즉, 0.59 nM, 0.58 nM, 0.57 nM 등이거나 또는 0.6 nM 미만의 임의의 값이다.

[0114] 한 실시태양에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 (^{125} I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는 하기 분석에서 설명되는 바와 같이, 목적하는 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 분석 (RIA)에 의해 측정된다 (Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293 : 865-881). 분석 조건을 확립하기 위해, 미세적정 플레이트 (다이넥스 (Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 μ g/ml의 포획 항-Fab 항체 (카펠랩스 (Cappel Labs))로 철야 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (약 23°C)에서 차단하였다. 비흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125} I]-항원을 목적하는 Fab의 연속 희석액과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599])의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 목적하는 Fab를 철야 인큐베이팅하지만, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이팅할 수 있다. 그 후, 혼합물은 실온에

서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이팅을 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% Tween-20으로 8회 세척한다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (scintillant) (MicroScint-20; 팩카드 (Packard))를 첨가하고, 플레이트를 Topcount 감마 계수기 (팩카드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 경쟁적 결합 분석에서 사용하기 위해 선택한다. 다른 실시태양에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 BIAcoreTM-2000 또는 BIAcoreTM-3000 (비아코아, 인크. (BIAcore, Inc., 미국 뉴저지주 피스카타웨이))를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용함으로써 측정한다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코아, 인크.)을 제조사의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\sim 0.2 \mu\text{M}$)으로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μl /분의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후에, 미반응기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입한다. 운동학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 약 25 μl /분의 유속으로 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 회합 및 해리 센소그램 (sensorgram)을 동시 피팅 (fitting)함으로써 단순 일대일 랭그뮐어 (Langmuir) 결합 모델 (BIAcore 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 으로서 계산한다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881] 참조). 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예를 들어 정지 유동 설치 분광분석기 (아비브 인스트루먼트즈 (Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (써모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 쉼팅 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0115] 본 발명에 따른 "온-레이트" 또는 "회합율" 또는 "회합 속도" 또는 " k_{on} "은 또한 상기한 바와 같은 BIAcoreTM-2000 또는 BIAcoreTM-3000 (비아코아, 인크., 미국 뉴저지주 피스카타웨이)를 사용하여 상기 설명된 동일한 표면 플라즈몬 공명 기술로 결정할 수 있다.

[0116] 본원에서 사용될 때 구문 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 특정 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주하도록 2개의 수치값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 연관되고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 연관됨) 사이에 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 항체에 대한 값의 함수로서, 바람직하게는 약 50% 미만, 바람직하게는 약 40% 미만, 바람직하게는 약 30% 미만, 바람직하게는 약 20% 미만, 바람직하게는 약 10% 미만이다.

[0117] 본원에서 사용될 때 구문 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 당업자가 특정 값 (예를 들어, Kd 값, HAMA 반응)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하도록 2개의 수치값 (일반적으로 하나는 본 발명의 항체와 연관되고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 연관됨) 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 항체에 대한 값의 함수로서, 바람직하게는 약 10% 초과, 바람직하게는 약 20% 초과, 바람직하게는 약 30% 초과, 바람직하게는 약 40% 초과, 바람직하게는 약 50% 초과이다.

[0118] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 소정의 항원이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 다른 천연 발생 또는 합성 화합물이다. 바람직하게는, 표적 항원은 폴리펩티드이다.

[0119] 본원의 목적을 위해 "억셉터 인간 프레임워크"는 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유도된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유도된" 억셉터 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 기존재하는 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 기존재하는 아미노산 변화가 존재할 경우, 바람직하게는 5 이하, 바람직하게는 4 이하, 또는 3 이하의 기존재하는 아미노산 변화가 존재한다. 기존재하는 아미노산 변화가 VH에 존재할 경우, 바람직하게는 상기 변화는 위치 71H, 73H 및 78H 중의 3개, 2개 또는 1개에서만 발생하고; 예를 들어, 상기 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 실시태양에서, VL 억셉터 인간 프레임워크의 서열은 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 동일하다.

- [0120] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔하게 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 선택된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군이다. 한 실시태양에서, VL에 대해서, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시태양에서, VH에 대해서, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.
- [0121] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 143)-H1-WVRQAPGKLEWV (서열 144)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRaedTAVYYC (서열 145)-H3-WGQGTLVTVSS (서열 146).
- [0122] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다: DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (서열 139)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (서열 140)-L2-GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열 141)-L3-FGQGTKEIKR (서열 142).
- [0123] "비변형된 인간 프레임워크"는 엑셉터 인간 프레임워크와 동일한 아미노산 서열을 갖는, 예를 들어 엑셉터 인간 프레임워크 내에 인간의 비-인간 아미노산으로의 치환(들)이 결여된 인간 프레임워크이다.
- [0124] 본 발명의 목적을 위해 "변경된 초가변 영역"은 그 안에 하나 이상의 (예를 들어 1 내지 약 16개의) 아미노산 치환(들)을 포함하는 초가변 영역이다.
- [0125] 본 발명의 목적을 위해 "비변형된 초가변 영역"은 그 영역이 유도된 비-인간 항체와 동일한 아미노산 서열을 갖는 초가변 영역, 즉, 그 안에 하나 이상의 아미노산 치환이 결여된 영역이다.
- [0126] 목적하는 항원, 예를 들어 종양-연관 폴리펩티드 항원 표적에 "결합하는" 항체는 항체가 항원을 발현하는 세포 또는 조직을 표적화할 때 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 항원에 결합하고, 다른 단백질과 유의하게 교차반응하지 않는 것이다. 그러한 실시태양에서, "비-표적" 단백질에 대한 항체의 결합의 정도는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사면역분석법 (RIA)에 의해 결정할 때 그의 특정 표적 단백질에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만일 것이다. 표적 분자에 대한 항체의 결합에 대해서, 용어 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인"은 비-특이적인 상호작용과 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적인 결합은 예를 들어 일반적으로 결합 활성을 갖지 않는 유사한 구조의 분자인 대조 분자의 결합에 비해 분자의 결합을 결정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 특이적인 결합은 표적, 예를 들어 과량의 비-표지된 표적에 유사한 대조 분자와의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이 경우에, 특이적인 결합은 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지된 표적에 의해 경쟁적으로 억제될 경우에 표시된다. 본원에서 사용될 때, 용어 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인"은 예를 들어 표적에 대한 Kd가 적어도 약 10^{-4} M, 별법으로 적어도 약 10^{-5} M, 별법으로 적어도 약 10^{-6} M, 별법으로 적어도 약 10^{-7} M, 별법으로 적어도 약 10^{-8} M, 별법으로 적어도 약 10^{-9} M, 별법으로 적어도 약 10^{-10} M, 별법으로 적어도 약 10^{-11} M, 별법으로 적어도 약 10^{-12} M, 또는 이보다 큰 분자에 의해 제시될 수 있다. 한 실시태양에서, 용어 "특이적인 결합"은 분자가 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 경우의 결합을 의미한다.
- [0127] "CD79b 폴리펩티드를 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하는" 항체 또는 "성장 억제성" 항체는 적절한 CD79b 폴리펩티드를 발현하거나 과발현하는 암 세포의 측정가능한 성장 억제를 유도하는 것이다. CD79b 폴리펩티드는 암 세포의 표면 상에 발현된 막횡단 폴리펩티드일 수 있거나 또는 암 세포에 의해 생산되고 분비되는 폴리펩티드일 수 있다. 바람직한 성장 억제성 항-CD79b 항체는 적절한 대조군 (일반적으로, 대조군은 시험되는 항체로 처리되지 않은 종양 세포임)에 비해 CD79b-발현 종양 세포의 성장을 20% 초과, 바람직하게는 약 20% 내지 약 50%, 훨씬 더 바람직하게는 50% 초과 (예를 들어, 약 50% 내지 약 100%)의 수준으로 억제한다. 한 실시태양에서, 성장 억제는 세포 배양액에서 약 0.1 내지 30 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 0.5 nM 내지 200 nM의 항체 농도에서 측정될 수 있고, 여기서 성장 억제는 종양 세포의 항체에 대한 노출 1-10일 후에 결정한다. 생체 내에서 종양 세포의 성장 억제는 하기 실험 실시예 섹션에서 설명되는 바와 같이 다양한 방식으로 결정될 수 있다. 항체는 항-CD79b 항체를 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 100 mg/kg 체중으로 투여할 때 종양 크기 또는 종양 세포 증식이 처음 항체

투여시로부터 약 5 내지 3개월 내에, 바람직하게는 약 5 내지 30일 이내에 감소하면 생체 내에서 성장 억제성인 것이다.

[0128] "세포사멸을 유도하는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 소포 (세포자멸체로 칭함)의 형성에 의해 결정되는, 예정된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 세포는 대체로 CD79b 폴리펩티드를 과다발현하는 것이다. 바람직하게는, 세포는 종양 세포, 예를 들어, 조혈 세포, 예를 들어 B 세포, T 세포, 호염기구, 호산구, 호중구, 단핵구, 혈소판 또는 적혈구이다. 세포사멸과 관련된 세포 사건을 평가하기 위한 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 포스포티딜 세린 (PS) 전위 (translocation)는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고; DNA 단편화는 DNA 래더링 (laddering)을 통해 평가할 수 있고; DNA 단편화와 함께 핵/염색질의 응축은 저이배체 (hypodiploid) 세포의 임의의 증가에 의해 평가할 수 있다. 바람직하게는, 세포사멸을 유도하는 항체는 아넥신 결합 분석에서 비처리 세포에 비해 아넥신 결합의 유도를 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 야기하는 것이다.

[0129] "세포 사멸을 유도하는" 항체는 생존가능한 세포를 비생존가능한 것으로 만드는 것이다. 상기 세포는 CD79b 폴리펩티드를 발현하고, CD79b 폴리펩티드를 특이적으로 발현하거나 과다발현하는 세포 종류의 세포이다. 세포는 특정 세포 종류의 양성 또는 정상 세포일 수 있다. CD79b 폴리펩티드는 암세포의 표면에 발현된 막형단 폴리펩티드일 수 있거나 또는 암세포에 의해 생산되어 분비된 폴리펩티드일 수 있다. 세포는 암 세포, 예를 들어, B 세포 또는 T 세포일 수 있다. 시험관 내 세포 사멸은 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)에 의해 유도된 세포 사멸을 구별하기 위해서 보체 및 면역 효과기 세포의 부재 하에 결정할 수 있다. 따라서, 세포 사멸에 대한 분석은 열 불활성화된 혈청을 사용하여 (즉, 보체의 부재 하에) 및 면역 효과기 세포의 부재 하에 수행할 수 있다. 항체가 세포 사멸을 유도할 수 있는지를 결정하기 위해, 요오드화 프로피듐 (PI), 트리판 블루 ([Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 평가되는 막 투과성의 상실을 비처리 세포와 비교하여 평가할 수 있다. 바람직한 세포 사멸-유도 항체는 BT474 세포에서의 PI 흡수 분석에서 PI 흡수를 유도하는 것이다.

[0130] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 의미하고, 항체 이소형에 따라 상이하다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0131] 용어 "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역을 포함하여, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위하여 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226, 또는 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 그의 카르복실-말단으로 확장되도록 규정된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 생산 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 처리에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.

[0132] "기능성 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "효과기 기능"을 갖는다. 예시적인 "효과기 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 상기 효과기 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합할 것을 필요로 하고, 예를 들어 본원의 정의란에 개시된 바와 같은 다양한 분석법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0133] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이인자형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 및 그의 천연 발생 변이체를 포함한다.

[0134] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환(들)에 의해 천연 서열 Fc 영역의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교시에, 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 영역에서 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게, 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 바람직하게는 적어도 약 80%의 서열 동일성, 또는 가장 바람직하게는 적어도 약 90%의 서열 동일성, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 95% 이상의 서열 동일성을 가질 것이다.

- [0135] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비형 Ig가, 상기 세포독성의 효과기 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 의미한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장시키고", 상기 사멸에 절대적으로 필요하다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하고, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험 관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로, 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.
- [0136] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적 스플라이싱된 형태를 포함하여 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하는 것이다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 예를 들어 문헌 ([Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)]에 개시되어 있다. 미래에 확인되는 것을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 상기 용어는 또한 모체 IgG의 태아로의 전달 ([Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 작용하는 신생아의 수용체인 FcRn을 포함한다.
- [0137] 생체내 인간 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 영역을 갖는 폴리펩티드가 투여된 영양류에서 분석될 수 있다. WO 00/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다 (또한, 예를 들어, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)] 참조).
- [0138] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 일반적으로 바람직하다. 효과기 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리할 수 있다.
- [0139] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에 표적 세포의 용해를 의미한다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 동족 (cognate) 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의)에 결합시킴으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)]에 기재된 CDC 분석을 수행할 수 있다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열 (변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드) 및 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 미국 특허 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다 (또한 예를 들어, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)] 참조).
- [0140] 용어 "Fc 영역-포함 항체"는 Fc 영역을 포함하는 항체를 의미한다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 정제 동안 또는 항체를 코딩하는 핵산의 재조합 처리에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 항체를 포함하는 조성물은 K447을 갖는 항체, 모든 K447 잔기가 제거된 항체, 또는 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0141] CD79b 폴리펩티드 "세포외 도메인" 또는 "ECD"는 본질적으로 막횡단 및 세포질 도메인이 존재하지 않는 CD79b 폴리펩티드의 형태를 의미한다. 통상적으로, CD79b 폴리펩티드 ECD는 1% 미만의 상기 막횡단 및/또는 세포질 도메인을 가질 것이고, 바람직하게는 0.5% 미만의 상기 도메인을 가질 것이다. 본 발명의 CD79b 폴리펩티드에 대해 확인된 임의의 막횡단 도메인은 소수성 도메인의 종류를 확인하기 위해 당업계에서 통상적으로 사용되는 기준에 따라 확인됨이 이해될 것이다. 막횡단 도메인의 정확한 경계는 상이할 수 있지만, 본원에서 초기에 확인된 도메인의 어느 한 말단 상의 약 5개 이하의 아미노산이 상이할 가능성이 가장 크다. 따라서, 임의로 CD79b 폴리펩티드의 세포외 도메인은 실시예 또는 명세서에서 확인된 막횡단 도메인/세포외 도메인 경계의 어느

한 측면에 약 5개 이하의 아미노산을 함유할 수 있고, 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 상기 폴리펩티드 및 이들을 코딩하는 핵산이 본 발명에서 고려된다.

[0142]

본원에 개시된 CD79b 폴리펩티드의 "신호 펩티드"의 대략적인 위치가 본 명세서 및/또는 첨부 도면에 제시될 수 있다. 그러나, 신호 펩티드의 C-말단 경계는 상이할 수 있지만, 본원에서 초기에 확인된 신호 펩티드 C-말단 경계의 어느 한 측면 상의 약 5개 이하의 아미노산이 상이할 가능성이 가장 크고, 여기서 신호 펩티드의 C-말단 경계는 아미노산 서열의 종류를 확인하기 위해 당업계에서 통상적으로 사용되는 기준에 따라 확인될 수 있음이 이해될 것이다 (예를 들어, 문헌 [Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997)] 및 [von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)]). 또한, 일부 경우에, 분비형 폴리펩티드로부터 신호 서열의 절단이 완전히 균일하지는 않고, 따라서 2 이상의 분비형 종류가 생성됨이 이해된다. 신호 펩티드가 본원에서 초기에 확인된 신호 펩티드의 C-말단 경계의 어느 한 측면 상의 약 5개 이하의 아미노산 내에서 절단된 상기 성숙 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본 발명에서 고려된다.

[0143]

"CD79b 폴리펩티드 변이체"는 본원에 개시된 전장 천연 서열 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 결여된 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 CD79b 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 전장 CD79b 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편 (예를 들어, 전장 CD79b 폴리펩티드의 완전한 코딩 서열의 일부만을 나타내는 핵산에 의해 코딩되는 것)과 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는, 본원에 정의된 바와 같은 CD79b 폴리펩티드, 바람직하게는 활성 CD79b 폴리펩티드를 의미한다. 상기 CD79b 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기가 전장 천연 아미노산 서열의 N-또는 C-말단에서 부가 또는 결실된 CD79b 폴리펩티드를 포함한다. 통상적으로, CD79b 폴리펩티드 변이체는 본원에 개시된 전장 천연 서열 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 결여된 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 CD79b 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 전장 CD79b 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편과 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 통상적으로, CD79b 변이체 폴리펩티드의 길이는 적어도 약 10개 아미노산, 별법으로 적어도 약 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, 600개 이상의 아미노산이다. 임의로, CD79b 변이체 폴리펩티드는 천연 CD79b 폴리펩티드 서열에 비해 1개 이하의 보존적 아미노산 치환, 별법으로 천연 CD79b 폴리펩티드 서열에 비해 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이하의 보존적 아미노산 치환을 가질 것이다.

[0144]

본원에서 확인된 펩티드 또는 폴리펩티드 서열, 즉, CD79b 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 특이적인 펩티드 또는 폴리펩티드 서열, 즉, CD79b 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 범위에 포함되는 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 달성에 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 값 %는 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성되고, ALIGN-2 프로그램의 완전한 소스 코드 (source code)는 하기 표 1에 제시된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크. 소유로서, 하기 표 1에 제시된 소스 코드는 미국 저작권 (U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디. 씨. 20559)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크로부터 공개적으로 입수가능하거나, 하기 표 1에 제시된 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.

[0145]

아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 제시된 아미노산 서열 A의 제시된 아미노산 서열 B에 대한 아미노산 서열 동일성 % (별법으로 제시된 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 제시된 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0146]

100 x X/Y

- [0147] 상기 식에서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.
- [0148] "CD79b 변이체 폴리뉴클레오티드" 또는 "CD79b 변이체 핵산 서열"은 본원에 정의된 바와 같은 CD79b 폴리펩티드, 바람직하게는 활성 CD79b 폴리펩티드를 코딩하고, 본원에 개시된 전장 천연 서열 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 결합된 전장 천연 서열 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 CD79b 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 전장 CD79b 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편 (예를 들어, 전장 CD79b 폴리펩티드의 완전한 코딩 서열의 일부분을 나타내는 핵산에 의해 코딩되는 것)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 통상적으로, CD79b 변이체 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 전장 천연 서열 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 결합된 전장 천연 서열 CD79b 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 서열이 존재하거나 존재하지 않는 CD79b 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 전장 CD79b 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편을 코딩하는 핵산 분자와 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 핵산 서열 동일성을 가질 것이다. 변이체는 천연 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.
- [0149] 통상적으로, CD79b 변이체 폴리뉴클레오티드의 길이는 적어도 약 5개 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 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, 또는 1000개 뉴클레오티드이고, 상기 맥락에서 용어 "약"은 언급된 뉴클레오티드 서열 길이 $\pm$ 언급된 길이의 10%를 의미한다.
- [0150] 본원에서 확인된 CD79b 코딩 핵산 서열에 대한 "핵산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭을 도입시킨 후, CD79b 핵산 서열 내의 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열 내의 뉴클레오티드의 백분율로서 정의된다. 핵산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 범위에 포함되는 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 핵산 서열 동일성 값 %는 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성되고, ALIGN-2 프로그램의 완전한 소스 코드는 하기 표 1에 제시된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크. 소유로서, 하기 표 1에 제시된 소스 코드는 미국 저작국 (미국 워싱턴 디. 씨. 20559)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크로부터 공개적으로 입수가능하거나, 하기 표 1에 제시된 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.
- [0151] 핵산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 제시된 핵산 서열 C의 제시된 핵산 서열 D에 대한 핵산 서열 동일성 % (별법으로 제시된 핵산 서열 D에 대해 특정 핵산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 제시된 핵산 서열 C로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:
- [0152] $100 \times W/Z$
- [0153] 상기 식에서, W는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 C 및 D의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 뉴클레오티드의 수이고, Z는 D의 뉴클레오티드의 총수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않을 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 %는 C에 대한 D의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 구체적으로 나타내지 않으면, 본원에 사용된 모든 핵산 서열 동일성 값 %는 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 문단에서 설명된 바와 같이 얻는다.
- [0154] 다른 실시태양에서, CD79b 변이체 폴리뉴클레오티드는 CD79b 폴리펩티드를 코딩하고, 바람직하게는 엄격한 혼성화 및 세척 조건 하에 본원에 개시된 전장 CD79b 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는

핵산 분자이다. CD79b 변이체 폴리펩티드는 CD79b 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

- [0155] CD79b 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 대해 사용될 때, 용어 "전장 코딩 영역"은 본 발명의 전장 CD79b 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드의 서열을 의미한다 (첨부 도면에 종종 출발 코돈으로부터 정지 코돈에 이르기까지의 서열로 제시됨). ATCC에 기탁된 핵산에 대해 사용될 때, 용어 "전장 코딩 영역"은 ATCC에 기탁된 벡터 내에 삽입된 cDNA의 CD79b 폴리펩티드-코딩 부분을 의미한다 (첨부 도면에 종종 출발 코돈으로부터 정지 코돈에 이르기까지의 서열로 제시됨 (출발 및 정지 코돈은 도면에서 굵은 글씨체로 밑줄로 나타낸다)).
- [0156] 본원에 개시된 다양한 CD79b 폴리펩티드를 설명하기 위해 사용될 때, "단리된"은 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 일반적으로 폴리펩티드의 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 폴리펩티드는 (1) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지 또는 (2) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 염색을 사용하여 비-환원 또는 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는 CD79b 폴리펩티드의 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0157] "단리된" CD79b 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 다른 폴리펩티드-코딩 핵산은 폴리펩티드-코딩 핵산의 자연 환경에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 분리된 핵산 분자이다. 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 환경과 다른 것이다. 따라서, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 자연 세포에 존재하는 특정 폴리펩티드-코딩 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는, 예를 들어 핵산 분자가 천연 세포의 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재하는, 폴리펩티드를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자를 포함한다.
- [0158] 용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 예를 들어, 원핵 세포에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서 (enhancer)를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0159] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 예비 서열 또는 분비 리더용 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비 단백질로서 발현될 경우 폴리펩티드용 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 줄 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고, 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 위치할 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접함을 의미하고, 분비 리더의 경우 인접하고 리딩 페이스 (reading phase)로 존재한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 상기 부위가 존재하지 않을 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (adaptor) 또는 링커가 통상의 용례에 따라 사용된다.
- [0160] 혼성화 반응의 "엄격성"은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 실험적으로 계산된다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 더 높은 온도가 필요하고, 프로브가 짧으면 보다 낮은 온도가 필요하다. 혼성화는 일반적으로 상보성 가닥이 그의 용점 미만의 환경에 존재할 때 변성 DNA가 재어닐링되는 능력에 따라 결정된다. 프로브와 혼성화 서열 사이의 요구되는 상동성 정도가 클수록 사용될 수 있는 상대적 온도가 더 높다. 그 결과, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 만들고, 보다 낮은 온도는 덜 엄격하게 만드는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격성에 대한 추가의 상세한 내용 및 설명에 대해서는 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.
- [0161] 본원에서 규정되는 바와 같은 "엄격한 조건" 또는 "고엄격성 조건"은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도, 예를 들어 50℃의 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트의 사용; (2) 혼성화 동안 변성제, 예를 들어 포름아미드, 예를 들어 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% Ficoll/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.5) + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨 (42℃)의 사용; 또는 (3) 42℃의 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨)를 사용한 10분 세척, 이어서 55℃의 EDTA 함유 0.1 x SSC로 구성된 10분 동안의 고엄격성 세척과 함께, 42℃에서 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M/시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트 (Denhardt) 용액, 초음파 처리된 언어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용한 철야 혼성화에 의해 확인될 수 있다.

- [0162] "중등 엄격성 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 확인할 수 있고, 상기한 것보다 엄격성이 낮은 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온 강도 및 %SDS)의 사용을 포함한다. 중등 엄격성 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10 % 텍스트란 술페이트, 및 20 mg/ml 변성 전단 처리 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 37°C에서의 철야 인큐베이션, 이어서 약 37-50°C의 1 x SSC를 사용한 필터의 세척을 포함한다. 당업자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 조정하기 위해 필요한 온도, 이온 강도 등의 조정 방법을 알 것이다.
- [0163] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프 태깅된 (tagged)"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 CD79b 폴리펩티드 또는 항-CD79b 항체를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 의미한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 작용할 수 있는 에피토프를 제공하도록 충분한 잔기를 갖지만, 그가 융합되는 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 또한, 태그 폴리펩티드는 바람직하게는 상기 항체가 다른 에피토프에는 실질적으로 교차반응하지 않도록 매우 특이적이다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 적어도 6개의 아미노산 잔기, 보통 약 8 내지 약 50개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 약 20개의 잔기)를 갖는다.
- [0164] 본 발명의 목적을 위해 "활성의" 또는 "활성"은 천연 또는 자연 발생 CD79b의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 보유하는 CD79b 폴리펩티드의 형태(들)를 의미하고, "생물학적" 활성은 천연 또는 자연 발생 CD79b가 갖는 항원 에피토프에 대해 작용하는 항체의 생산을 유도하는 능력 이외의 다른, 천연 또는 자연 발생 CD79b에 의해 유발되는 생물학적 기능 (억제성 또는 자극성)을 의미하고, "면역학적" 활성은 천연 또는 자연 발생 CD79b가 갖는 항원 에피토프에 대해 작용하는 항체의 생산을 유도하는 능력을 의미한다.
- [0165] 용어 "길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 천연 CD79b 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화하는 임의의 분자를 포함한다. 유사한 방식으로, 용어 "작용제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 천연 CD79b 폴리펩티드의 생물학적 활성을 모방하는 임의의 분자를 포함한다. 적합한 작용제 또는 길항제 분자는 구체적으로 작용제 또는 길항제 항체 또는 항체 단편, 천연 CD79b 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 펩티드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 유기 소분자 등을 포함한다. CD79b 폴리펩티드의 작용제 또는 길항제를 확인하기 위한 방법은 CD79b 폴리펩티드를 후보 작용제 또는 길항제 분자와 접촉시키고 CD79b 폴리펩티드와 통상적으로 관련되는 하나 이상의 생물학적 활성의 검출가능한 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.
- [0166] "정제된"은 그를 함유하는 샘플의 적어도 95 중량%, 또는 적어도 98 중량%의 농도로 분자가 샘플 내에 존재함을 의미한다.
- [0167] "단리된" 핵산 분자는 예를 들어 그의 자연 환경에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 다른 핵산 분자로부터 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 핵산 분자를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 추가로 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외부에 존재하거나 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0168] 본원에서 사용될 때 용어 "벡터"는 그가 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 나타내도록 의도된다. 한 종류의 벡터는 그 내부에 추가의 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 의미하는 "플라스미드"이다. 다른 종류의 벡터는 파지 벡터이다. 또다른 종류의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 그가 도입되는 숙주 세포 내에서 자동 복제할 수 있다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 그에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 그들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "재조합 벡터")로서 칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태로 존재한다. 플라스미드는 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0169] "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 본원에서 상호교환가능하게 사용될 때 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 의미하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형 뉴클레오타이드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오타이드 및 그들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열에는 비-뉴클레오타이드 성분이 개재될 수 있다. 폴리

뉴클레오타이드는 예를 들어 표지에 대한 접합에 의해 합성 후에 추가로 변형될 수 있다. 다른 종류의 변형은 예를 들어 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드의 유사체로의 "캡 (cap)" 치환, 뉴클레오타이드간 변형, 예를 들어, 전하를 띄지 않는 연결기 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등)로 및 전하를 띤 연결기 (예를 들어, 포스포로디티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형, 매달린 모이어티, 예를 들어, 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 인터칼레이터 (intercalator) (예를 들어, 아크리딘, 솔라렌 등)을 갖는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등)을 함유하는 것, 알킬레이터를 함유하는 것, 변형 연결기 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)를 갖는 것과, 폴리뉴클레오타이드(들)의 비변형 형태를 포함한다. 또한, 당 내에 보통 존재하는 임의의 히드록실기는 예를 들어 포스포네이트기, 포스포에이트기에 의해 교체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오타이드에 대해 추가의 연결기를 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 교체 또는 반-교체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캐핑 (capping)기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사형, 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당, 예를 들어 아라비노스, 자일로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥토로스, 비환식 유사체 및 염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어 메틸 리보시드를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결기는 대체 연결기로 교체될 수 있다. 상기 대체 연결기는 포스포에이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결기를 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬임)로 교체되는 실시태양을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 연결기가 동일할 필요는 없다. 상기 설명은 RNA 및 DNA를 포함하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0170] 본원에서 사용될 때 "올리고뉴클레오타이드"는 반드시 아니지만, 일반적으로 길이가 약 200개 뉴클레오타이드 미만인 짧은, 일반적으로 단일 가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오타이드를 일반적으로 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호 배제하는 의미가 아니다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기 설명은 올리고뉴클레오타이드에 동등하고 충분히 적용가능하다.

[0171] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 조혈계 암 또는 혈액-관련 암, 예를 들어 림프종, 백혈병, 골수종 또는 림프양 악성종양, 및 비장암, 림프절의 암 및 암종, 모세포종 및 육종을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 암의 보다 특정한 예는 B-세포 연관 암, 예를 들어 고등급, 중등급 및 저등급 림프종 (B 세포 림프종, 예를 들어 점막-연관-림프양 조직 B 세포 림프종 및 비-호지킨 림프종 (NHL), 외투층 세포 림프종, 버키트 림프종, 소형 림프구성 림프종, 변연대 림프종, 미만성 대세포 림프종, 여포성 림프종, 및 호지킨 림프종 및 T 세포 림프종 포함) 및 백혈병 (2차 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 예를 들어 B 세포 백혈병 (CD5+ B 림프구 포함), 골수성 백혈병, 예를 들어 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 림프구성 백혈병, 예를 들어 급성 림프모구 백혈병 (ALL) 및 골수이형성증), 및 다른 혈액 및/또는 B 세포- 또는 T-세포-연관 암을 포함한다. 또한, 추가의 조혈 세포, 예를 들어 다형핵 백혈구, 예를 들어 호염기구, 호산구, 호중구 및 단핵구, 수지상 세포, 혈소판, 적혈구 및 천연 킬러 세포의 암도 포함된다. 다음 중에서 선택된 암성 B 세포 증식성 장애도 포함된다: 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 (hairy cell) 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종. B-세포 암의 기원은 다음을 포함한다: 변연대 B-세포 림프종은 변연대의 기억 B-세포에서 유래하고, 여포성 림프종 및 미만성의 거대 B-세포 림프종은 배증심의 밝은 대역 내의 중심세포에서 유래하고, 만성 림프구성 백혈병 및 소형 림프구성 백혈병은 B1 세포 (CD5+)에서 유래하고, 외투층 세포 림프종은 외투층 내의 나이브 B-세포에서 유래하고, 버키트 림프종은 배증심의 암 대역의 중심모세포에서 유래한다. 본원에서 "조혈 세포 조직"으로 언급되는 조혈 세포를 포함하는 조직은 흉선 및 골수 및 말초 림프 조직, 예를 들어 비장, 림프절, 점막과 연관된 림프 조직, 예를 들어 장-연관 림프 조직, 편도, 파이어 판 (Peyer's patch) 및 충수돌기 및 다른 점막, 예를 들어 기관지 내막과 연관된 림프 조직을 포함한다. 상기 암의 추가의 특정 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장관암, 췌장암, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암종, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 백혈병 및 다른 림프구 증식성

장애, 및 다양한 종류의 두경부암을 포함한다.

[0172] 본원에서 "B-세포 종양"은 비-호지킨 림프종 (NHL), 예를 들어 저등급/여포성 NHL, 소형 림프구성 (SL) NHL, 중등급/여포성 NHL, 중등급 미만성 NHL, 고등급 면역모세포 NHL, 고등급 림프모구 NHL, 고등급 작은 비-절단된 세포 NHL, 거대 질병 (bulky disease) NHL, 외투층 세포 림프종, AIDS-관련 림프종, 및 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증, 비-호지킨 림프종 (NHL), 림프구 우세 호지킨병 (LPHD), 소형 림프구 림프종 (SLL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 무통성 NHL, 예를 들어 재발형 무통성 NHL 및 리톡시맙-불응성 무통성 NHL; 백혈병, 예를 들어 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모발 세포 백혈병, 만성 골수모구성 백혈병; 외투층 세포 림프종; 및 다른 혈액 종양을 포함한다. 상기 종양은 B-세포 표면 마커, 예를 들어 CD79b에 대해 작용하는 항체로 치료될 수 있다. 상기 질병은 B 세포 표면 마커, 예를 들어 CD79b에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료되는 것으로 본원에서 고려되고, 비접합된 ("네이키드") 항체 또는 본원에 개시된 바와 같이 세포독성제에 접합된 항체의 투여를 포함한다. 또한, 상기 질병은 본 발명의 항-CD79b 항체 또는 본 발명의 항-CD79b 항체 약물 접합체를 다른 항체 또는 항체 약물 접합체, 다른 세포독성제, 방사선 조사 또는 다른 치료와 동시에 또는 연속적으로 투여하는 조합 요법에 의해 치료되는 것으로 본원에서 고려된다. 본 발명의 예시적인 치료 방법에서, 본 발명의 항-CD79b 항체는 항-CD20 항체, 면역글로불린, 또는 그의 CD20 결합 단편과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 항-CD20 항체는 네이키드 항체 또는 항체 약물 접합체일 수 있다. 조합 요법의 실시태양에서, 항-CD79b 항체는 본 발명의 항체이고, 항-CD20 항체는 Rituxan® (리톡시맙)이다.

[0173] 본원에서 사용되는 용어 "비-호지킨 림프종" 또는 "NHL"은 호지킨 림프종 이외의 림프계의 암을 의미한다. 호지킨 림프종은 일반적으로 호지킨 림프종에 리드-스틴버그 (Reed-Sternberg) 세포가 존재하고 비-호지킨 림프종에 상기 세포가 존재하지 않는다는 사실에 의해 비-호지킨 림프종과 구별될 수 있다. 본원에서 사용되는 상기 용어에 포함되는 비-호지킨 림프종의 예는 당업계에 공지된 분류 방식, 예를 들어 문헌 [Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000)]에 기재된 Revised European-American Lymphoma (REAL) 방식에 따라 당업자 (예를 들어, 종양학자 또는 병리학자)에 의해 확인되는 임의의 림프종을 포함한다. 특히, 도 11.57, 11.58 및 11.59의 목록을 참조한다. 보다 구체적인 예는 재발된 또는 불응성 NHL, 전선 (front line) 저등급 NHL, 단계 III/IV NHL, 화학요법 내성 NHL, 전구체 B 림프모구 백혈병 및/또는 림프종, 소형 림프구 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병 및/또는 전림프구성 백혈병 및/또는 소형 림프구성 림프종, B-세포 전림프구성 림프종, 면역종 및/또는 림프형질세포성 림프종, 림프형질세포성 림프종, 변연대 B 세포 림프종, 비장 변연대 림프종, 림프절외 변연대 - MALT 림프종, 림프절 변연대 림프종, 모발 세포 백혈병, 형질세포종 및/또는 형질세포 골수종, 저등급/여포성 림프종, 중등급/여포성 NHL, 외투층 세포 림프종, 여포 중심 림프종 (여포성), 중등급 미만성 NHL, 미만성의 거대 B-세포 림프종, 활동성 NHL (활동성 전선 NHL 및 활동성 재발 NHL), 자가 줄기세포 이식 후에 재발된 또는 이식에 불응성인 NHL, 원발성 종격의 거대 B-세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 고등급 면역모세포성 NHL, 고등급 림프모구 NHL, 고등급 비-절단된 소세포 (small non-cleaved cell) NHL, 거대 질병 NHL, 버키트 림프종, 전구체 (말초) 대과립 림프구성 백혈병, 균상식육종 및/또는 세자리 (Sezary) 증후군, 피부 (cutaneous) 림프종, 큰세포 역형성 림프종, 혈관종심성 림프종을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0174] "질환"은 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 사용한 치료로부터 이익을 얻는 임의의 병태이다. 이것은 포유동물이 문제의 질병에 걸리기 쉽게 하는 병태를 포함하는 만성 및 급성 질환 또는 질병을 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 질환의 비제한적인 예는 암성 병태, 예를 들어 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프양 악성종양; 신경세포, 아교세포, 성상세포, 시상하부 및 다른 선, 포식세포, 상피, 간질 및 포배강 (blastocoelic) 질환; 및 염증, 면역 및 다른 혈관신생-관련 질환을 포함한다. 질환은 추가로 암성 병태, 예를 들어 B 세포 증식성 장애 및/또는 B 세포 종양, 예를 들어, 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종을 포함한다.

[0175] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 일정 정도의 비정상적인 세포 증식과 연관된 질환을 나타낸다. 한 실시태양에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0176] 본원에서 사용될 때 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다.

[0177] 본원에서 "자가면역 질병"은 개체의 자기 자신의 조직 또는 장기 또는 동시 분리계 (co-segregate)로부터 상기

자기 자신의 조직 등에 대해 발생하는 질병 또는 질환 또는 그의 증상 또는 그로부터 발생하는 병태이다. 많은 상기 자가면역 및 염증성 질환에서, 많은 임상적 및 실험적 마커가 존재할 수 있으며, 이에 는 과감마글로불린혈 증, 자가항체의 높은 수준, 조직 내의 항원-항체 복합체 침착, 코르티코스테로이드 또는 면역억제 치료로부터의 이점, 및 이환된 조직에서의 림프구양 세포 집합체가 포함되나 이에 제한되지 않는다. B-세포 매개 자가면역 질병에 대해 임의의 특정 이론에 제한되지 않지만, B 세포는 자가항체 생산, 면역 복합체 형성, 수지상 및 T-세포 활성화, 시토킨 합성, 직접 케모킨 방출 및 이소성 신생 림프 형성을 위한 핵심 장소의 제공을 포함하여, 많은 기계적인 경로를 통한 인간 자가면역 질병에서 발병 효과를 보이는 것으로 생각된다. 각각의 상기 경로는 자가면역 질병의 발병시에 상이한 정도로 참여할 수 있다.

[0178]

"자가면역 질병"은 장기-특이적 질병 (즉, 면역 반응은 내분비계, 조혈계, 피부, 심폐계, 위장관계 및 간계, 신장계, 갑상선, 귀, 신경근육계, 중추신경계 등과 같은 장기계에 대해 특이적으로 작용함) 또는 다수의 장기계에 영향을 줄 수 있는 전신 질병 (예를 들어, 전신 홍반 루푸스 (SLE), 류마티스성 관절염, 다발성 근육염 등)일 수 있다. 바람직한 상기 질병은 자가면역 류마티스성 질환 (예를 들어, 류마티스성 관절염, 쇼그렌 (Sjogren) 증후군, 공피증, 루푸스, 예를 들어 SLE 및 루푸스 신장염, 다발성 근육염/피부근육염, 한랭글로불린혈증, 항-인지질 항체 증후군, 및 건선성 관절염), 자가면역 위장관 및 간 질환 (예를 들어, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양성 대장염 및 크론 (Crohn) 병), 자가면역 위염 및 악성 빈혈, 자가면역 간염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 및 복강 질환), 혈관염 (예를 들어 ANCA-음성 혈관염 및 ANCA-관련 혈관염, 예를 들어 처크-스트라우스 (Churg-Strauss) 혈관염, 베게너 (Wegener) 육아종증, 및 현미경적 다발성 혈관염), 자가면역 신경 질환 (예를 들어, 다발성 경화증, 안진전 간대성 근경련 증후군, 중증 근무력증, 시신경척수염, 파킨슨 (Parkinson) 병, 알츠하이머 (Alzheimer) 병, 및 자가면역 다발성 신경병증), 신장 질환 (예를 들어, 사구체신염, 구드패스츄어 (Goodpasture) 증후군, 및 버거 (Berger) 병), 자가면역 피부 질환 (예를 들어, 건선, 두드러기, 심상성 천포창, 수포성 유사천포창, 및 피부 홍반성 루프스), 혈액 질환 (예를 들어, 혈소판감소 자색반, 혈전 혈소판감소 자색반, 수혈후 자색반, 및 자가면역 용혈 빈혈), 죽상경화증, 포도막염, 자가면역 청각 질환 (예를 들어, 내이 질환 및 난청), 베체트 (Behcet) 병, 레이노 (Raynaud) 증후군, 장기 이식 및 자가면역 내분비 질환 (예를 들어, 당뇨병-관련 자가면역 질병, 예를 들어 인슐린-의존 당뇨병 (IDDM), 애디슨 (Addison) 병, 및 자가면역 갑상선 질환 (예를 들어, 그레이브 (Grave) 병 및 갑상선염))을 포함한다. 보다 바람직한 상기 질병은 예를 들어 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, ANCA-관련 혈관염, 루푸스, 다발성 경화증, 쇼그렌 증후군, 그레이브 병, IDDM, 악성 빈혈, 갑상선염, 및 사구체신염을 포함한다.

[0179]

몇몇 경우에 상기 나열된 것을 포함하는, 본원에 규정된 다른 자가면역 질병의 구체적인 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 관절염 (급성 및 만성 류마티스성 관절염, 예를 들어 연소성 발병 류마티스성 관절염 및 병기, 예를 들어 류마티스성 활막염, 통풍 또는 통풍성 관절염, 급성 면역학적 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 타입 II 콜라겐 유발 관절염, 감염성 관절염, 라임 (Lyme) 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 스틸 (Still) 병, 척추 관절염, 골관절염, 만성 프로그레디엔테 (chronica progrediente) 관절염, 변형 관절염, 만성 원발성 (chronica primaria) 다발관절염, 반응성 관절염, 폐경기 관절염, 에스트로겐 결핍 관절염, 및 강직 척추염/류마티스성 척추염), 자가면역 림프구 증식 질병, 염증성 과다증식성 피부병, 건선, 예를 들어 반상 건선, 물방울 모양 (gutatte) 건선, 농포성 건선, 및 손톱 건선, 아토피, 예를 들어 아토피성 질병, 예를 들어 고초열 및 욱 (Job) 증후군, 피부염, 예를 들어 접촉 피부염, 만성 접촉 피부염, 탈락 피부염, 알레르기 피부염, 알레르기 접촉 피부염, 두드러기, 포진성 피부염, 화폐상 피부염, 지루성 피부염, 비-특이적 피부염, 원발성 자극성 접촉성 피부염 및 아토피성 피부염, x-관련 과다 IgM 증후군, 알레르기성 안내 염증성 질환, 만성 자가면역 담마진을 비롯한 담마진, 예를 들어 만성 알레르기성 담마진 및 만성 특발성 담마진, 근육염, 다발성 근육염/피부근육염, 아동 피부근육염, 독성 표피 괴사성 용해, 경피증 (전신성 경피증 포함), 경화증, 예를 들어 전신성 경화증, 다발성 경화증 (MS), 예를 들어 척수-눈 (spino-optical) MS, 원발성 진행성 MS (PPMS) 및 재발 완화형 MS (RRMS), 진행성 전신성 경화증, 죽상경화증, 동맥경화증, 파종성 경화증, 실조성 경화증, 시신경 척수염 (NMO), 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론 병, 자가면역-매개 위장관 질환, 위장관염증, 대장염, 예를 들어 궤양성 대장염, 현미경적 대장염, 콜라겐성 대장염, 폴립성 대장염, 괴사성 전장염, 및 전층의 대장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 장 염증, 괴저성 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 성인성 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)을 비롯한 호흡 곤란 증후군, 수막염, 포도막의 전체 또는 부분 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액성 질환, 이식편 대 숙주 질환, 혈관부종, 예를 들어 유전성 혈관부종, 수막염에서의 뇌신경 손상, 임신성 포진, 임신성 유사천포창, 음낭 소양증, 자가면역 조숙 난소 부전, 자가면역 상태로 인한 돌발성 청각 상실, IgE-매개 질환, 예를 들어 아나필락시스 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염, 예를 들어 라스무센 (Rasmussen) 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예를 들어 앞포도막염,

급성 앞포도막염, 육아종성 포도막염, 비-육아종성 포도막염, 수정체항원성 포도막염, 뒤포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신중후군이 있거나 없는 사구체신장염 (GN), 예를 들어 만성 또는 급성 사구체신장염, 예를 들어 원발성 GN, 면역-매개 GN, 막성 GN (막성 신장병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신장병증, 유형 I 및 유형 II를 비롯한 막- 또는 막성 증식성 GN (MPGN), 및 급속 진행성 GN (RPGN), 증식성 신장염, 자가면역 다분비선 내분비 부전, 국한성 형질세포 귀두염을 비롯한 귀두염, 귀두포피염, 중심원심성 윤상 홍반, 지속성 피부이색성 홍반, 다형 홍반, 윤상 육아종, 광택 태선, 경화성 및 위축성 태선, 단순 만성 태선, 극상 태선, 편평 태선, 판상 어린선, 표피박리성 과각화증, 전암성 각화증, 괴저성 농피증, 알레르기성 상태 및 반응, 음식 알레르기, 약물 알레르기, 곤충 알레르기, 희귀 알레르기성 장애, 예를 들어 비만세포증, 알레르기성 반응, 알레르기성 또는 아토피성 습진, 건조 습진, 발한장애성 습진 및 소수포성 수장족저 습진을 비롯한 습진, 천식, 예를 들어 기관지성 천식, 기관지 천식 및 자가면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 상태, 외래 항원, 예를 들어 임신 동안 태아 A-B-O 혈액형에 대한 면역 반응을 수반하는 질환, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 루푸스, 예를 들어 신장염 루푸스, 뇌염 루푸스, 소아 루푸스, 비-신장 루푸스, 신장의 루푸스, 원판상 루푸스 및 원판상 홍반성 루푸스, 탈모성 루푸스, SLE, 예를 들어 피부 SLE, 아급성 피부 SLE, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 및 파종상 홍반성 루푸스, 연소성 발병 (타입 I) 당뇨병, 예를 들어 소아 IDDM, 성인 발병 당뇨병 (타입 II 당뇨병), 자가면역 당뇨병, 특발성 요붕증, 당뇨병 망막병증, 당뇨병 신장병증, 당뇨병 대장염, 당뇨병 대동맥 장애, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연 과민과 관련된 면역 반응, 결핵, 사르코이드증, 림프종양 육아종증을 비롯한 육아종증, 무과립증, 맥관염 (예를 들어 대혈관 혈관염, 예를 들어 류머티스성 다발성 근육통 및 거대-세포 (타카야사 (Takayasu)) 동맥염, 중간혈관 혈관염, 예를 들어 카와사키 (Kawasaki) 병 및 결절성 다발성 동맥염/결절성 동맥주위염, 면역혈관염, CNS 혈관염, 피부 혈관염, 과민 혈관염, 괴사성 혈관염, 예를 들어 섬유소성 괴사성 혈관염, 전신성 괴사성 혈관염, ANCA-음성 혈관염 및 ANCA-관련 혈관염, 예를 들어 처크-스트라우스 증후군 (CSS), 베게너 육아종증, 및 현미경적 다발성 혈관염), 관자 동맥염, 재생불량성 빈혈, 자가면역 재생불량성 빈혈, 콕스 (Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 (Diamond Blackfan) 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈 (AIHA)을 비롯한 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈, 악성 빈혈, 에디슨병, 적혈구계 빈혈 또는 무형성증 (PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역성 호중구감소증 (들), 혈구감소증, 예를 들어 범혈구감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 누출과 관련된 질환, CNS 염증성 장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 기관 손상 증후군, 예를 들어 패혈증, 외상 또는 출혈에 대한 이차성 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 운동신경염, 알레르기성 신경염, 베체트병/증후군, 캐슬먼 (Castelman) 증후군, 구드페이스류어 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐스-존슨 (Stevens-Johnson) 증후군, 유사천포창 또는 천포창, 예를 들어 수포성 유사천포창, 반흔성 (점막) 유사천포창, 피부 유사천포창, 심상성 천포창, 부신생물성 천포창, 낙엽상 천포창, 점막 유천포창 및 홍반 천포창, 후천성 수포성 표피 박리증, 안구 염증, 바람직하게는 알레르기성 안구 염증, 예를 들어 알레르기성 결막염, 선형 IgA 수포 질환, 자가면역-유발 결막 염증, 자가면역 다내분비질환, 라이터 (Reiter) 질환 또는 증후군, 자가면역 상태로 인한 열 손상, 전자간증, 면역 복합성 장애, 예를 들어 면역 복합성 신장염, 항체-매개 신장염, 신경염증성 장애, 다발성 신경병증, 만성 신경병증, 예를 들어 IgM 다발성 신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 저혈소판증 (예를 들어, 심근 경색 환자에 의해 발병됨), 예를 들어 혈전 저혈소판 자반병 (TTP), 수혈후 자반병 (PTP), 헤파린-유도 저혈소판증, 및 자가면역 또는 면역-매개 저혈소판증, 예를 들어 특발성 저혈소판자반병 (ITP) (만성 또는 급성 ITP 포함), 공막염, 예를 들어 특발성 각공막염, 상공막염, 고환 및 난소의 자가면역 질환 (자가면역 고환염 및 난소염 포함), 원발성 갑상선기능저하증, 부갑상선기능저하증, 자가면역 내분비 질환, 예를 들어 갑상선염, 예를 들어 자가면역 갑상선염, 하시모토 (Hashimoto) 병, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염) 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선기능저하증, 그레이브 병, 그레이브 안질환 (안병증 또는 갑상선-관련 안병증), 다분비선 증후군, 예를 들어 자가면역 다분비선 증후군, 예를 들어 유형 I (또는 다분비선 내분비병증 증후군), 신경학적 부신생물 증후군, 예를 들어 램버트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력증 증후군 또는 이튼-램버트 (Eaton-Lambert) 증후군을 비롯한 부신생물 증후군, 근육강직 (stiff-man 또는 stiff-person) 증후군, 뇌척수염, 예를 들어 알레르기 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근육 무력증, 예를 들어 흉선종-관련 중증 근육 무력증, 소뇌변성, 신경근강직증, 안진전 또는 안진전 근경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다소성 운동 신경병증, 쉬한 (Sheehan) 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역 만성 활성 간염, 폐렴, 예를 들어 림프양 간질 폐렴 (LIP), 폐쇄 세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 버거 병 (IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선상 IgA 피부병, 급성 유열 호중구성 피부병, 각질화 농포성 피부병, 일과성 극세포해리 피부병, 경화증, 예를 들어 원발성 담관성 경화증 및 폐경화증, 자가면역 장병증 증후군, 복강 질환, 비열대 스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글로불린혈증, 예를 들어 혼합 한랭

글로불린혈증, 근위축 측삭 경화증 (ALS; 루게릭 (Lou Gehrig) 병), 관상 동맥 질환, 자가면역 귀 질환, 예를 들어 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청각 상실, 다발성연골염, 예를 들어 불응성 또는 재발된 또는 재발형 다발성연골염, 폐단백증, 각막염, 예를 들어 코간 (Cogan) 증후군/비-매독성 간질성 각막염, 벨 (Bell) 마비, 스위트 (Sweet) 질환/증후군, 자가면역 딸기코, 포진 (zoster)-관련 통증, 아밀로이드증, 비-암성 림프구 증가증, 원발성 림프구 증가증 (모노클로날 B 세포 림프구 증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마병증 및 비결정된 중요 모노클로날 감마병증, MGUS) 포함), 말초신경병증, 부신생물 증후군, 채널병증, 예를 들어 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 실명, 주기성 마비, 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근육병증, 국소성 또는 분절성 또는 국소성 분절성 사구체경화증 (FSGS), 내분비 안구병증, 포도막망막염, 맥락막염, 자가면역 간장 장애, 섬유근육통, 다내분비 기능부전, 쉬미트 증후군, 부신염, 위 위축, 초로성 치매, 탈수초 질환, 예를 들어 자가면역 탈수초 질환 및 만성 염증성 탈수초 다발성 신경병증, 드레슬러 증후군, 원형 탈모증, 전체 탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이나우드 현상, 식도 운동장애, 수지경화증 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역 불임, 예를 들어, 항-정자 항체로 인한 불임, 혼합성 결합 조직 질환, 샤가스병, 류마티스성 열, 재발형 유산, 농부 폐, 다형 홍반, 심장절개후 증후군, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 조류 사육자 폐, 알레르기성 육아종 맥관염, 양성 림프구성 맥관염, 알포트 (Alport) 증후군, 폐포염, 예를 들어 알레르기성 폐포염 및 섬유성 폐포염, 간질성 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 기생충 질환, 예를 들어 리슈만편모충증, 파동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 (Sampter) 증후군, 카플란 (Caplan) 증후군, 탕기열, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 확산 간질성 폐 섬유증, 간질성 폐 섬유증, 섬유성 종격염, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 안구내염, 장기 용기성 홍반 (erythema elevatum et diutinum), 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 (Shulman) 증후군, 펠티 (Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예를 들어 만성 섬모체염, 이시성 섬모체염, 홍채섬모체염 (급성 또는 만성), 또는 푸크 (Fuch) 섬모체염, 헤노흐-셴라인 (Henoch-Schonlein) 자색반, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, SCID, 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 에코바이러스 감염, 폐혈증 (전신성 염증성 반응 증후군 (SIRS)), 내독소혈증, 체장염, 티록신증, 파보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신처리후 증후군, 선천 풍진 감염, 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 감염, 볼거리, 에반 (Evan) 증후군, 자가면역 생식선 기능부전, 시덴함 (Sydenham) 무도병, 연쇄상구균 감염후 신염, 폐색성 혈전혈관염, 갑상선독소증, 척수 매독, 맥락막염, 거대-세포 다발성근육통, 만성 과민 폐렴, 결막염, 예를 들어 봄철 카타르, 건조 각막결막염 및 유행성 각막결막염, 특발성 신장염 증후군, 최소 변화 신장병증, 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상, 이식 기관 재관류, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도/폐 질환, 규폐증, 아프타, 아프타 구내염, 동맥경화성 장애 (뇌혈관 부전증), 예를 들어 동맥경화성 뇌병증 및 동맥경화성 망막병증, 무정자형성증, 자가면역 용혈, 뵈크 (Boeck) 병, 한랭글로불린혈증, 뉘피트렌 (Dupuytren) 구축, 수정체 아낙필라시성 안염, 알레르기성 장염, 나성 결절성 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 류머티스성 열, 하만-리치 (Hamman-Rich) 병, 감각신경 청각 상실, 발작성 혈색소뇨증, 성선기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구 감소증, 염증성 단핵구증, 횡단 척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신장증, 교감성 안염, 신생아 안염, 시각 신경염, 육아종성 고환염, 체장염, 급성 다발성 신경근염, 괴저성 농피증, 케르바인 (Quervain) 갑상선염, 후천성 비장 위축증, 비-악성 흉선종, 림프성 모낭 홍선염, 백반증, 독성-쇼크 증후군, 음식 중독, T 세포 침윤과 관련된 상태, 백혈구-부착 결핍증, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연 과민과 관련된 면역 반응, 백혈구 누출과 관련된 질환, 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 자가면역 다내분비질환, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축성 위염, 류머티스성 질환, 혼합성 결합 조직 질환, 신증후군, 체도염, 다내분비 부전, 자가면역 다분비선 증후군, 예를 들어 다분비선 증후군 유형 I, 성인발병형 특발성 부갑상선기능저하증 (AOIH), 심근병증, 예를 들어 확장성 심근병증, 후천성 수포 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신증후군, 원발성 경화성 담관염, 화농성 또는 비-화농성 부비동염, 급성 또는 만성 부비동염, 별집, 전두, 상악 또는 접형 부비동염, 알레르기성 부비동염, 호산구-관련 장애, 예를 들어 호산구증가증, 폐 침윤 호산구증가증, 호산구증가증-근육통 증후군, 로플러 (Loffler) 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구증가증, 기관지폐 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 또는 호산구 함유 육아종, 아나필락시스, 척추관절병증, 혈청검사 음성인 척추관절염, 다내분비 자가면역 질환, 경화성 담관염, 공막, 상공막, 만성 점막피부 칸디다증, 브루톤 (Bruton) 증후군, 유아의 일과성 저감마글로불린혈증, 위스코트-알드리치 (Wiskott-Aldrich) 증후군, 혈관확장성 운동실조증 증후군, 혈관확장증, 콜라겐 질환과 관련된 자가면역 장애, 류머티즘, 예를 들어 만성 관절류머티즘, 림프절염, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능장애, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각과민, 신장 허혈, 뇌 허혈, 및 혈관화 동반 질환, 알레르기성 과민 장애, 사구체신염, 재관류 손상, 허혈성 재관류 장애, 심근 또는 다른 조직의 재관류 손상, 림프종성 기관기관지염, 염증성 피부병, 급성 염증성 성분을 동반한 피부병, 다발성 기관 부전, 수포성 질환, 신장 피질 괴사, 급성 화농성 수막염 또는 기타 중추신경계 염증성 장애, 눈 및 안와 염증성 장애, 과립구 수혈-관련 증후군, 시토킨-유도 독성, 기면증, 급성 중증

염증, 만성 난치 염증, 신우염, 동맥내막 과증식증, 위궤양, 관막염 및 자궁내막증이다. 상기 질병은 B 세포 표면 마커, 예를 들어 CD79b에 결합하는 항체의 투여에 의해 치료되는 것으로 본원에서 고려되고, 비접합된 ("네이키드") 항체 또는 본원에 개시된 세포독성제에 접합된 항체의 투여를 포함한다. 또한, 상기 질병은 동시에 또는 연속적으로 투여되는 다른 항체 또는 항체 약물 접합체, 다른 세포독성제, 방사선 조사 또는 다른 치료제와 본 발명의 항-CD79b 항체 또는 항-CD79b 항체 약물 접합체의 조합 요법에 의해 치료되는 것으로 본 발명에서 고려된다.

[0180] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "완화"는 표적 병리학적 상태 또는 질환을 억제하거나 그의 진행 속도를 느리게 하는 (완화하는) 것을 목적으로 하는 치료 목적의 처치 및 예방 또는 억제 처치를 모두 의미한다. 치료가 필요한 대상체는 질환이 이미 발생한 대상체 및 질환을 갖기 쉬운 대상체 또는 질환이 억제되어야 하는 대상체를 포함한다. 대상체 또는 포유동물은 본 발명의 방법에 따라, 치료량의 항-CD79b 항체를 투여한 후, 환자가 다음 중 하나 이상의 관찰가능한 및/또는 측정가능한 감소 또는 부재를 보일 경우에 CD79b 폴리펩티드-발현 암에 대해 성공적으로 "치료된다": 암 세포의 수 감소 또는 암 세포의 부재; 종양 크기의 감소; 암의 연조직 및 뼈 내로의 전이를 포함하여 말초 장기 내로 암 세포 침윤의 억제 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장의 어느 정도의 억제 및/또는 특이적인 암과 연관된 하나 이상의 증상의 어느 정도의 경감; 이환률 및 사망률 감소, 및 삶의 질 개선. 상기 항-CD79b 항체가 암세포 성장을 억제하고/하거나 존재하는 암세포를 사멸시킬 정도로, 항체는 세포증식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 또한, 상기 징후 또는 증상의 감소는 환자가 지각할 수도 있다.

[0181] 질병의 성공적인 치료 및 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 의사에게 잘 알려진 통상적인 절차에 의해 쉽게 측정가능하다. 암 치료를 위해, 효능은 예를 들어 질병 진행시까지의 시간 (TTP)의 평가 및/또는 반응 속도 (RR)의 결정에 의해 측정할 수 있다. 전이는 병기 분류 시험 및 칼슘 수준 및 뼈 내로의 전이의 정도를 결정하기 위한 다른 효소에 대한 시험에 의해 결정될 수 있다. 또한, 영역 내의 골반 및 림프절로의 전이를 관찰하기 위해 CT 스캔을 수행할 수 있다. 흉부 X-선 및 공지의 방법에 의한 간 효소 수준의 측정을 사용하여 폐 및 간으로의 전이를 각각 관찰한다. 질병을 모니터링하기 위한 다른 통상적인 방법은 경직장 초음파영상 (TRUS) 및 경직장 생검 (TRNB)을 포함한다.

[0182] 보다 국소 암인 방광암에 대해, 질병의 진행을 결정하기 위한 방법은 방광경 검사에 의한 소변 세포 평가, 소변 내 혈액의 존재 모니터링, 초음파 검사 또는 정맥 신우 조영사진에 의한 요로상피의 가시화, 컴퓨터 단층촬영 (CT) 및 자기 공명 영상화 (MRI)를 포함한다. 원격 전이의 존재는 복부 CT, 흉부 x-선, 또는 골격의 방사선 핵종 영상화에 의해 평가될 수 있다.

[0183] "만성" 투여는 급성 방식과 달리 연장된 기간 동안 초기 치료 효과 (활성)를 유지하기 위해 연속적인 방식으로 물질(들)을 투여하는 것을 의미한다. "간헐적" 투여는 중단없이 연속적으로 행해지지 않지만, 특성상 주기적인 치료이다.

[0184] "개체"는 척추동물이다. 특정 실시태양에서, 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 농장 동물 (예를 들어 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예를 들어 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시태양에서, 포유동물은 인간이다.

[0185] 암 증상의 완화 치료를 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완동물, 예를 들어 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등을 포함하여 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0186] 하나 이상의 추가의 치료제와 "조합한" 투여는 동시 (병용) 및 임의의 순서로 연속 투여하는 것을 포함한다.

[0187] 본원에서 사용될 때, "담체"는 사용되는 용량 및 농도에서 그에 대해 노출되는 세포 또는 포유동물에게 무독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 pH 완충된 수용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개의 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 또는 리신; 당알류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN®, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 PLURONICS®를 포함한다.

- [0188] "고체상" 또는 "고체 지지체"는 본 발명의 항체가 점착 또는 부착될 수 있는 비-수성 매트릭스를 의미한다. 본원에 포함되는 고체상의 예는 부분적으로 또는 전적으로 유리 (예를 들어, 제어된 공극 유리), 다당류 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘으로 형성된 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 문맥에 따라, 고체상은 분석 플레이트의 웰을 포함할 수 있고; 다른 부분에서는 정제 컬럼 (예를 들어, 친화도 크로마토그래피 컬럼)일 수 있다. 또한, 이 용어는 미국 특허 4,275,149에 기재된 것과 같은, 별개 입자의 비연속적 고체상을 포함한다.
- [0189] "리포좀"은 약물 (예를 들어 CD79b 항체)을 포유동물에게 전달하기 위해 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 베지클이다. 리포좀의 성분은 통상적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 2층 구조로 배열된다.
- [0190] "소분자" 또는 "유기 소분자"는 본원에서 분자량이 약 500 달톤 미만인 것으로 규정된다.
- [0191] "개체", "대상체" 또는 "환자"는 척추동물이다. 특정 실시태양에서, 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 농장 동물 (예를 들어 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예를 들어 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시태양에서, 포유동물은 인간이다.
- [0192] 용어 "제약 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과를 보이도록 하는 형태이고 제제가 투여되는 대상체에 허용되지 않은 독성을 보이는 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다. 상기 제제는 멸균 상태이다.
- [0193] "멸균" 제제는 무균 상태이거나 또는 모든 살아있는 미생물 및 이들의 포자가 존재하지 않는다.
- [0194] 본원에 개시된 항체의 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급된 목적과 관련하여 통상적인 방법으로 실험에 의해 결정될 수 있다.
- [0195] 용어 "치료 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질병 또는 질환의 "치료"에 효과적인 항체 또는 다른 약물의 양을 지칭한다. 암의 경우, 치료 유효량의 약물은 암 세포 수의 감소, 종양 크기의 감소, 말초 장기로의 암 세포 침윤의 억제 (즉, 어느 정도의 지연 및 바람직하게는 정지); 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도의 지연 및 바람직하게는 정지); 어느 정도의 종양 성장의 억제; 및/또는 암과 관련된 하나 이상의 증상의 어느 정도의 경감을 달성할 수 있다. 상기 "치료"에 대한 본원의 정의를 참고한다. 약물이 암세포 성장을 억제하고/하거나 존재하는 암세포를 사멸시킬 정도로, 상기 약물은 세포증식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. "예방 유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 예방 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 나타낸다. 반드시 아니지만 대개, 예방 용량은 질병의 보다 초기 단계 전에, 또는 보다 초기 단계에서 대상체에서 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다.
- [0196] 항-CD79b 항체의 "성장 억제량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어, 암 세포의 성장을 시험관 내에서 또는 생체 내에서 억제할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 항-CD79b 항체의 "성장 억제량"은 통상적으로 방식으로 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0197] 항-CD79b 항체의 "세포독성량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어, 암 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 파괴할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 항-CD79b 항체의 "세포독성량"은 통상적으로 방식으로 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0198] "CD79b-발현 세포"는 내인성 또는 형질감염된 CD79b 폴리펩티드를 세포 표면 상에 또는 분비된 형태로 발현하는 세포이다. "CD79b-발현 암"은 세포 표면 상에 존재하는 CD79b 폴리펩티드를 갖거나 또는 CD79b 폴리펩티드를 생산하고 분비하는 세포를 포함하는 암이다. "CD79b-발현 암"은 항-CD79b 항체가 그에 대해 결합하여 암에 대해 치료 효과를 가질 수 있도록, 그의 세포 표면 상에 충분한 수준의 CD79b 폴리펩티드를 임의로 생산한다. 다른 실시태양에서, "CD79b-발현 암"은 항-CD79b 항체 길항제가 그에 대해 결합하여 암에 대해 치료 효과를 가질 수 있도록, 임의로 충분한 수준의 CD79b 폴리펩티드를 생산하고 분비한다. 후자의 경우에, 길항제는 종양 세포에 의한 분비형 CD79b 폴리펩티드의 생산 및 분비를 감소, 억제 또는 방지하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. CD79b 폴리펩티드를 "과다발현하는" 암은 동일한 조직 종류의 비-암성 세포에 비해 그의 세포 표면에서 유의하게 더 높은 수준의 CD79b 폴리펩티드를 갖거나, 생산하고 분비하는 것이다. 상기 과다발현은 유전자 증폭 또는 전사 또는 번역 증가에 기인할 수 있다. CD79b 폴리펩티드 과다발현은 세포 표면 상에 존재하거나 또는 세포에 의해 분비된 증가된 수준의 CD79b 단백질을 평가함으로써 검출 또는 예측 분석으로 결정될 수 있다 (예를 들어, CD79b 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산으로부터 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있는 단리된 CD79b 폴리펩티드에 대해 제조된 항-CD79b 항체를 사용한 면역조직화학 분석; FACS 분석 등을 통해). 별

법으로, 또는 추가로, CD79b 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 mRNA의 수준은 예를 들어 CD79b-코딩 핵산 또는 그의 상보체에 대응하는 핵산 기반 프로브를 사용한 형광 계내 혼성화 (FISH; 1998년 10월 공개된 W098/45479 참조), 서던 (Southern) 블로팅, 노던 (Northern) 블로팅, 또는 증합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예를 들어 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)을 통해 세포에서 측정할 수 있다. CD79b 폴리펩티드 과다발현은 예를 들어 항체 기반 분석 (또한, 예를 들어, 1990년 6월 12일 등록된 미국 특허 4,933,294; 1991년 4월 18일 공개된 W091/05264; 1995년 3월 28일 등록된 미국 특허 5,401,638; 및 문헌 [Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)] 참조)을 사용하여 생물학적 유체, 예를 들어 혈청 내의 발산된 항원을 측정하여 연구할 수 있다. 상기 분석 외에, 다양한 생체 내 분석을 당업자는 이용할 수 있다. 예를 들어, 환자의 신체 내의 세포를 검출가능한 표지, 예를 들어, 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 노출시킨 후, 예를 들어, 방사성의 외부 스캐닝에 의해 또는 항체에 기호출된 환자로부터 얻은 생검의 분석에 의해, 환자에서 항체의 세포에 대한 결합을 평가할 수 있다.

[0199] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역어드헤신"은 이중 단백질 ("어드헤신")의 "결합 특이성"을 면역글로불린 불변 도메인의 효과기 기능과 조합한 항체 유사 분자를 나타낸다. 구조적으로, 면역어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외의 (즉, "이중"인) 다른 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 면역어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 일반적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접한 아미노산 서열이다. 면역어드헤신 내의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 서브타입, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 얻을 수 있다.

[0200] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표지"는 "표지된" 항체를 생성시키기 위해 항체에 직접 또는 간접적으로 접합된 검출가능한 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체로 검출가능하거나 (예를 들어 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.

[0201] 본원에서 사용되는 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 제한하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제 (예를 들어, 메토타렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제 (intercalating agent), 효소 및 그의 단편, 예를 들어 핵산분해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체, 및 아래에 개시된 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하고자 의도된다. 다른 세포독성제는 아래에 기재된다. 살종양제는 종양 세포를 파괴한다.

[0202] "독소"는 세포의 성장 또는 증식에 유해한 효과를 보일 수 있는 임의의 물질이다.

[0203] "화학요법제"는 작용 메커니즘과 상관없이 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 종류는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 알킬화제, 항대사물질, 방추체 독 (spindle poison) 식물 알칼로이드, 세포독성/항종양 항생제, 토포이소머라제 억제제, 항체, 광감수성 증가 물질 (photosensitizer), 및 키나제 억제제. 화학요법제는 "표적화 요법" 및 통상적인 화학요법에 사용되는 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예는 다음을 포함한다: 에를로티닙 (TARCEVA(등록상표), 제넨테크/오에스아이 팜. (OSI Pharm.)), 도세탁셀 (TAXOTERE(등록상표), 사노피-아벤티스 (Sanofi-Aventis)), 5-FU (플루오로우라실, 5-플루오로우라실, CAS No. 51-21-8), 겐시타빈 (GEMZAR(등록상표), 릴리 (Lilly)), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, 화이자 (Pfizer)), 시스플라틴 (시스-디아민, 디클로로백금(II), CAS No. 15663-27-1), 카르보플라틴 (CAS No. 41575-94-4), 파클리탁셀 (TAXOL(등록상표), 브리스톨-마이어스 스кви브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴욕주 프린스턴), 트라스투주맙 (HERCEPTIN(등록상표), 제넨테크), 테모졸로미드 (4-메틸-5-옥소-2,3,4,6,8-펜타아자바이시클로 [4.3.0] 노나-2,7,9-트리엔-9-카르복사미드, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR(등록상표), TEMODAL(등록상표), 셰링 플로 (Schering Plough)), 타목시펜 ((Z)-2-[4-(1,2-디페닐부트-1-에닐)페녹시]-N,N-디메틸-에탄아민, NOLVADEX(등록상표), ISTUBAL(등록상표), VALODEX(등록상표)), 및 독소루비신 (ADRIAMYCIN(등록상표)), Akti-1/2, HPPD, 및 라파마이신.

[0204] 화학요법제의 보다 많은 예는 다음을 포함한다: 옥살리플라틴 (ELOXATIN(등록상표), 사노피), 보르테조미드 (VELCADE(등록상표), 밀레니엄 팜. (Millennium Pharm.)), 수텐트 (SUNITINIB(등록상표), SU11248, 화이자), 레트로졸 (FEMARA(등록상표), 노바티스 (Novartis)), 이마티닙 메실레이트 (GLEEVEC(등록상표), 노바티스), XL-518 (Mek 억제제, 엑셀릭시스 (Exelixis), WO 2007/044515), ARRY-886 (Mek 억제제, AZD6244, 어레이 바이

오파마 (Array BioPharma), 아스트라제네카 (AstraZeneca), SF-1126 (PI3K 억제제, 세마포어 파마슈티칼스 (Semafore Pharmaceuticals)), BEZ-235 (PI3K 억제제, 노바티스), XL-147 (PI3K 억제제, 엑셀릭시스), PTK787/ZK 222584 (노바티스), 폴베스트란트 (FASLODEX(등록상표), 아스트라제네카), 류코보린 (폴린산), 라파마이신 (시를리무스, RAPAMUNE(등록상표), 와이어스 (Wyeth)), 라파티닙 (TYKERB(등록상표), GSK572016, 글락소스미스클라인 (GlaxoSmithKline)), 로나파르닙 (SARASAR™, SCH 66336, 셰링 플로), 소라페닙 (NEXAVAR(등록상표), BAY43-9006, 바이엘 랩스 (Bayer Labs)), 게피티닙 (IRESSA(등록상표), 아스트라제네카), 이리노테칸 (CAMPTOSAR(등록상표), CPT-11, 화이자), 티피파르닙 (ZARNESTRA™, 존슨 & 존슨 (Johnson & Johnson)), ABRAXANE™ (크레모포르-프리 (Cremophor-free)), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스 (American Pharmaceutical Partners, 미국 일리노이주 샤움버그)), 반데타닙 (rINN, ZD6474, ZACTIMA(등록상표), 아스트라제네카), 클로람부실, AG1478, AG1571 (SU 5271; 수겐 (Sugen)), 탐시롤리무스 (TORISEL(등록상표), 와이어스), 파조파닙 (글락소스미스클라인), 칸포스파미드 (TELCYTA(등록상표), 텔릭 (Telik)), 티오테파 및 시클로스포스파미드 (CYTOXAN(등록상표), NEOSAR(등록상표)); 알킬 술로네이트, 예를 들어 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄포테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도제레신, 카르제레신 및 비제레신 합성 유사체 포함); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 둘라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 에루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕타이인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로나파진, 클로로포스포라미드, 에스트라무스틴, 이포스포라미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 염산염, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테틴, 프레드니무스틴, 트로포스포라미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디와인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II (Angew, Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 (chromophore) 및 관련 발색단백질 에네디와인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신, 항대사제, 예를 들어 메토평렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 염산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메토평렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플로스우리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날, 예를 들어 아미노글루테치미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 프로리닌산; 아세글라톤; 알도스포라미드 글리코사이드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카바진; PSK(등록상표) 다당류 복합체 (제이에이치에스 내처럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 미국 오레곤주 유진)); 로족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안귀딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로스포라미드; 티오테파; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토평렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드 (VP-16); 이포스포라미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈 (NAVELBINE(등록상표)); 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 카페시타빈 (XELODA(등록상표), 로슈 (Roche)); 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 및 유도체.

[0205]

또한, "화합물"의 정의에는 다음이 포함된다: (i) 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을

하는 항-호르몬제, 예를 들어 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절인자 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (NOLVADEX(등록상표)); 타목시펜 시트레이트 포함), 랄록시펜, 드로록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 FARESTON(등록상표) (토레미펜 시트레이트); (ii) 부신선에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테치미드, MEGASE(등록상표) (메게스트롤 아세테이트), AROMASIN(등록상표) (엑세메스탄; 화이자), 포르메스탄, 파드로졸, RIVISOR(등록상표) (보로졸), FEMARA(등록상표) (레트로졸; 노바티스), 및 ARIMIDEX(등록상표) (아나스트로졸; 아스트라제네카); (iii) 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 및 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); (iv) 단백질 키나제 억제제, 예를 들어 MEK 억제제 (WO 2007/044515); (v) 지질 키나제 억제제; (vi) 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 이상 세포 증식에 연관되는 신호 전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 예를 들어 오블리메르센 (GENASENSE(등록상표), 겐타 인크. (Genta Inc.)); (vii) 리보자임, 예를 들어 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, ANGIOZYME(등록상표)) 및 HER2 발현 억제제; (viii) 백신, 예를 들어 유전자 요법 백신, 예를 들어 ALLOVECTIN(등록상표), LEUVECTIN(등록상표), 및 VAXID(등록상표); PROLEUKIN(등록상표) rIL-2; 토포이소머라제 1 억제제, 예를 들어 LURTOTECAN(등록상표); ABARELIX(등록상표) rmRH; (ix) 항-혈관신생제, 예를 들어 베바치주맙 (AVASTIN(등록상표), 제넨테크); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 및 유도체.

[0206]

또한, "화학요법제"의 정의에는 치료 항체, 예를 들어 알렘투주맙 (캄파쓰 (Campath)), 베바치주맙 (AVASTIN(등록상표), 제넨테크); 세톡시맙 (ERBITUX(등록상표), 임클론 (Imclone)); 파니투무맙 (VECTIBIX(등록상표), 암젠 (Amgen)), 리툭시맙 (Rituxan(등록상표), 제넨테크/바이오젠 이텍 (Biogen Idec)), 퍼투주맙 (OMNITARG™, 2C4, 제넨테크), 트라스투주맙 (HERCEPTIN(등록상표), 제넨테크), 토시투모맙 (백사 (Bexxar), 코릭시아 (Corixia)), 및 항체 약물 접합체, 겐투주맙 오조가미신 (MYLOTARG(등록상표), 와이어스)이 포함된다.

[0207]

본원에서 사용될 때, "성장 억제제"는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 세포, 특히 CD79b를 발현하는 암 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 CD79b를 발현하는 세포의 비율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 시기에) 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지까지 이어질 수 있다. 추가의 정보는 문헌 [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), 특히 p.13]에서 볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 주목에서 유도된 항암 약물이다. 유럽 주목에서 유도된 도세탁셀 (TAXOTERE(등록상표), 룽-프랑 로러 (Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (TAXOL(등록상표), 브리스톨-마이어스 스쿼브)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터 미세관의 회합을 촉진시키고, 세포의 유사분열을 억제하는 탈중합을 억제함으로써 미세관을 안정화시킨다.

[0208]

"독소루비신"은 안트라사이클린 항생제이다. 독소루비신의 전체적인 화학 명칭은 (8S-cis)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리테옥시- α -L-릭소-헥사피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

[0209]

용어 "시토킨"은 세포간 매개자로서 다른 세포에 대해 작용하는 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 관용어이다. 상기 시토킨의 예는 림포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬이다. 시토킨에는 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 전구인슐린; 릴렉신; 프로릴렉신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 난포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체 형성 호르몬 (LH); 간 성장인자; 섬모발 세포 성장인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 물리관 억제 물질; 마우스 고나도트로핀-회합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관내피 성장인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장인자, 예를 들어 NGF- β ; 혈소판-성장인자; 전환 성장인자 (TGF), 예를 들어 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린 유사 성장인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론- α , - β 및 - γ ; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터루킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF- α 또는 TNF- β ; 및 LIF

및 kit 리간드 (KL)를 포함하는 다른 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에서 사용되는 용어 시토킨은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양액으로부터의 단백질 및 천연 서열 시토킨의 생물학적 활성 균등물을 포함한다.

[0210] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 사용, 투여량, 투여에 대한 정보, 금기사항 및/또는 치료 제품 사용에 대한 경고를 포함하는, 치료 제품의 상업적 포장에 통상적으로 포함되는 사용 지시물을 지칭하기 위해 사용된다.

[0211] 용어 "세포내 대사물질"은 항체-약물 접합체 (ADC)에 대한 세포 내부의 대사 과정 또는 반응으로부터 생성되는 화합물이다. 대사 과정 또는 반응은 효소 과정, 예를 들어 ADC의 펩티드 링커의 단백질 분해 절단, 또는 관능기, 예를 들어 히드라존, 에스테르, 또는 아미드의 가수분해일 수 있다. 세포내 대사물질은 세포 내로의 도입, 확산, 섭취 또는 수송 후에 세포내 절단을 겪는 항체 및 유리 약물을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0212] 용어 "세포 내에서 절단된" 및 "세포내 절단"은 약물 모이어티 (D)와 항체 (Ab) 사이의 공유결합에 의한 부착, 즉 링커가 파괴되어 유리 약물을 세포 내에서 항체로부터 해리시키는, 항체-약물 접합체 (ADC)에 대한 세포 내의 대사 과정 또는 반응을 의미한다. 따라서, ADC의 절단된 모이어티는 세포내 대사물질이다.

[0213] 용어 "생체이용률"은 환자에게 투여된 약물의 소정량의 전신 이용률 (즉, 혈액/혈장 수준)을 의미한다. 생체이용률은 투여된 투여형으로부터 전신 순환계에 도달하는 약물의 시간 (속도) 및 총량 (정도)의 측정치를 나타내는 절대적인 용어이다.

[0214] 용어 "세포독성 활성"은 ADC 또는 ADC의 세포내 대사물질의 세포-사멸, 세포증식 억제 또는 성장 억제 효과를 의미한다. 세포독성 활성은 1/2의 세포가 생존하는 단위 부피당 농도 (몰 또는 질량)인 IC₅₀ 값으로서 표현될 수 있다.

[0215] 용어 "알킬"은 본원에서 사용될 때 1 내지 12개의 탄소 원자 (C₁-C₁₂)의 포화 직쇄 또는 분지쇄 일가 탄화수소 라디칼을 나타내고, 여기서 알킬 라디칼은 임의로 아래에서 설명되는 하나 이상의 치환체로 독립적으로 치환될 수 있다. 다른 실시태양에서, 알킬 라디칼은 1 내지 8개의 탄소 원자 (C₁-C₈), 또는 1 내지 6개의 탄소 원자 (C₁-C₆)이다. 알킬기의 예는 메틸 (Me, -CH₃), 에틸 (Et, -CH₂CH₃), 1-프로필 (n-Pr, n-프로필, -CH₂CH₂CH₃), 2-프로필 (i-Pr, i-프로필, -CH(CH₃)₂), 1-부틸 (n-Bu, n-부틸, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-메틸-1-프로필 (i-Bu, i-부틸, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-부틸 (s-Bu, s-부틸, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-메틸-2-프로필 (t-Bu, t-부틸, -C(CH₃)₃), 1-펜틸 (n-펜틸, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-펜틸 (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-펜틸 (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-메틸-2-부틸 (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-메틸-2-부틸 (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-메틸-1-부틸 (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-메틸-1-부틸 (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-헥실 (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-헥실 (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-헥실 (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-메틸-2-펜틸 (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-메틸-2-펜틸 (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-메틸-2-펜틸 (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-메틸-3-펜틸 (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-메틸-3-펜틸 (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-디메틸-2-부틸 (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-디메틸-2-부틸 (-CH(CH₃)C(CH₃)₃), 1-헵틸, 1-옥틸 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0216] 용어 "알케닐"은 적어도 하나의 불포화 부위, 즉 탄소-탄소, sp² 이중 결합을 갖는 2 내지 8개의 탄소 원자 (C₂-C₈)의 선형 또는 분지쇄 일가 탄화수소 라디칼을 나타내고, 여기서 알케닐 라디칼은 임의로 본원에서 설명되는 하나 이상의 치환체로 독립적으로 치환될 수 있고, "시스" 및 "트랜스" 배향, 또는 별법으로, "E" 및 "Z" 배향을 갖는 라디칼을 포함한다. 그 예는 에틸렌 또는 비닐 (-CH=CH₂), 알릴 (-CH₂CH=CH₂) 등을 포함한다.

[0217] 용어 "알키닐"은 적어도 하나의 불포화 부위, 즉 탄소-탄소, sp 삼중 결합을 갖는 2 내지 8개의 탄소 원자 (C₂-C₈)의 선형 또는 분지쇄 일가 탄화수소 라디칼을 나타내고, 여기서 알키닐 라디칼은 임의로 본원에서 설명되는 하나 이상의 치환체로 독립적으로 치환될 수 있다. 그 예는 에티닐 (-C≡CH), 프로피닐 (프로파르길, -CH₂C≡CH) 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0218] 용어 "카르보사이클", "카르보사이클릴", "카르보사이클릭 고리" 및 "사이클로알킬"은 모노사이클릭 고리로서 3 내지 12개의 탄소 원자 (C₃-C₁₂) 또는 바이사이클릭 고리로서 7 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 일가의 비-방향족 포화 또는 부분 불포화 고리를 의미한다. 7 내지 12개의 원자를 갖는 바이사이클릭 카르보사이클은 예를 들어 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열될 수 있고, 9 또는 10개의 고리 원자를 갖는 바이사이클릭 카르보사이클은 바이사이클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로서, 또는 가교 시스템, 예를 들어 바이사이클로[2.2.1]헵

탄, 바이시클로[2.2.2]옥탄 및 바이시클로[3.2.2]노난으로서 배열될 수 있다. 모노시클릭 카르보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, 1-시클로헥스-1-에닐, 1-시클로헥스-2-에닐, 1-시클로헥스-3-에닐, 시클로헥사디에닐, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 시클로노닐, 시클로데실, 시클로운데실, 시클로도데실 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0219]

"아릴"은 모 방향족 고리계의 단일 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자의 제거에 의해 유도된 6-20개의 탄소 원자 (C_6-C_{20})의 일가 방향족 탄화수소 라디칼을 의미한다. 일부 아릴기는 예시적인 구조에서 "Ar"로 표시된다. 아릴은 포화, 부분 불포화 고리, 또는 방향족 카르보시클릭 고리에 융합된 방향족 고리를 포함하는 바이시클릭 라디칼을 포함한다. 일반적인 아릴기는 벤젠으로부터 유도된 라디칼 (페닐), 치환 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 비페닐, 인데닐, 인다닐, 1,2-디히드로나프탈렌, 1,2,3,4-테트라히드로나프틸 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 아릴기는 임의로 본원에서 설명되는 하나 이상의 치환체로 독립적으로 치환된다.

[0220]

용어 "헤테로사이클", "헤테로시클릴" 및 "헤테로시클릭 고리"는 본원에서 상호 교환가능하게 사용되고, 적어도 하나의 고리 원자가 질소, 산소, 인 및 황 중에서 선택된 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 C인 3 내지 20개의 고리 원자의 포화 또는 부분 불포화 (즉, 하나 이상의 이중 및/또는 삼중 결합을 고리 내에 갖는다) 카르보시클릭 라디칼을 의미하고, 여기서 하나 이상의 고리 원자는 임의로 아래에서 설명되는 하나 이상의 치환체로 독립적으로 치환된다. 헤테로사이클은 3 내지 7원의 모노사이클 (2 내지 6개의 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S 중에서 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자) 또는 7 내지 10원의 바이사이클 (4 내지 9개의 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S 중에서 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자), 예를 들어 바이시클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템 일 수 있다. 헤테로사이클은 문헌 [Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 특히 Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9]; ["The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), 특히 Volumes 13, 14, 16, 19, and 28]; 및 [J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566]에 기재되어 있다. 또한, "헤테로시클릴"은 헤테로사이클 라디칼이 포화, 부분 불포화 고리, 또는 방향족 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 고리에 융합된 라디칼을 포함한다. 헤테로시클릭 고리의 예는 피롤리딘, 테트라히드로푸라닐, 디히드로푸라닐, 테트라히드로티에닐, 테트라히드로피라닐, 디히드로피라닐, 테트라히드로티오피라닐, 피페리딘, 모르폴리노, 티오모르폴리노, 티옥사닐, 피페라지닐, 호모피페라지닐, 아제티딘, 옥세타닐, 티에타닐, 호모피페리딘, 옥세파닐, 티에파닐, 옥사제피닐, 디아제피닐, 티아제피닐, 2-피롤리닐, 3-피롤리닐, 인돌리닐, 2H-피라닐, 4H-피라닐, 디옥사닐, 1,3-디옥솔라닐, 피라졸리닐, 디티아닐, 디티올라닐, 디히드로피라닐, 디히드로티에닐, 디히드로푸라닐, 피라졸리디닐, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 3-아자바이시클로[3.1.0]헥사닐, 3-아자바이시클로[4.1.0]헵타닐, 아자바이시클로[2.2.2]헥사닐, 3H-인돌릴 퀴놀리지닐 및 N-피리딜 우레아를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 또한, 스피로 모이어티가 상기 정의 내에 포함된다. 2개의 고리 탄소 원자가 옥소 (=O) 모이어티로 치환된 헤테로시클릭의 예는 피리미디노닐 및 1,1-디옥소-티오모르폴리닐이다. 본원에서 헤테로사이클기는 임의로 본원에서 설명되는 하나 이상의 치환체로 독립적으로 치환된다.

[0221]

용어 "헤테로아릴"은 5원, 6원, 또는 7원 고리의 일가 방향족 라디칼을 의미하고, 질소, 산소, 및 황 중에서 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 함유하는, 5-20개 원자의 융합 고리계 (이 중 적어도 하나는 방향족 임)를 포함한다. 헤테로아릴기의 예는 피리디닐 (예를 들어 2-히드록시피리디닐 포함), 이미다졸릴, 이미다조피리디닐, 피리미디닐 (예를 들어 4-히드록시피리미디닐 포함), 피라졸릴, 트리아졸릴, 피라지닐, 테트라졸릴, 푸릴, 티에닐, 이속사졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 이소티아졸릴, 피롤릴, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 인돌릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조푸라닐, 신놀리닐, 인다졸릴, 인돌리지닐, 프탈라지닐, 피리다지닐, 트리아지닐, 이소인돌릴, 프테리디닐, 푸리닐, 옥사디아졸릴, 트리아졸릴, 티아디아졸릴, 티아디아졸릴, 푸라자닐, 벤조푸라자닐, 벤조티오펜, 벤조티아졸릴, 벤즈옥사졸릴, 퀴나졸리닐, 퀴놀살리닐, 나프티리디닐, 및 푸로피리디닐이다. 헤테로아릴기는 임의로 본원에서 설명되는 하나 이상의 치환체로 독립적으로 치환된다.

[0222]

헤테로사이클 또는 헤테로아릴기는 가능한 경우에 탄소 (탄소-연결된), 또는 질소 (질소-연결된) 결합될 수 있다. 비제한적인 예로서, 탄소 결합되는 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 피리딘의 위치 2, 3, 4, 5, 또는 6, 피리다진의 위치 3, 4, 5, 또는 6, 피리미딘의 위치 2, 4, 5, 또는 6, 피라진의 위치 2, 3, 5, 또는 6, 푸란, 테트라히드로푸란, 티오푸란, 티오펜, 피롤 또는 테트라히드로피롤의 위치 2, 3, 4, 또는 5, 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 위치 2, 4, 또는 5, 이속사졸, 피라졸, 또는 이소티아졸의 위치 3, 4, 또는 5, 아지리딘의 위치 2 또는 3, 아제티딘의 위치 2, 3, 또는 4, 퀴놀린의 위치 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 또는 이소퀴놀린의 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8에 결합된다.

[0223] 비제한적인 예로서, 질소 결합되는 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 위치 1, 이소인돌, 또는 이소인돌린의 위치 2, 모르폴린의 위치 4, 및 카르바졸, 또는 β -카르볼린의 위치 9에 결합된다.

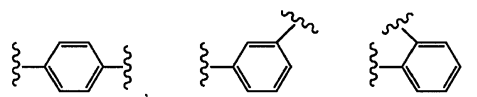
[0224] "알킬렌"은 1-18개 탄소 원자의 포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알칸의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 일가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알킬렌 라디칼은 메틸렌 ($-\text{CH}_2-$), 1,2-에틸 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-프로필 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-부틸 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0225] " C_1 - C_{10} 알킬렌"은 화학식 $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$ 의 직쇄, 포화 탄화수소기이다. C_1 - C_{10} 알킬렌의 예는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌, 헵틸렌, 옥틸렌, 노닐렌 및 데칼렌을 포함한다.

[0226] "알케닐렌"은 2-18개 탄소 원자의 불포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알켄의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 일가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알케닐렌 라디칼은 1,2-에틸렌 ($-\text{CH}=\text{CH}-$)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0227] "알키닐렌"은 2-18개 탄소 원자의 불포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알킨의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 일가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알키닐렌 라디칼은 아세틸렌 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), 프로파르길 ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), 및 4-펜티닐 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0228] "아릴렌"은 하기 구조로 제시되는 바와 같이 두개의 공유결합은 가지며 오르토, 메타, 또는 파라 입체형태로 존재할 수 있는 아릴 기이며, 여기서, 페닐 기는 비치환되거나, 또는 $-\text{C}_1$ - C_8 알킬, $-\text{O}$ -(C_1 - C_8 알킬), -아릴, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ - $\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, -할로젠, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ 및 $-\text{CN}$ (여기서, 각각의 R' 는 독립적으로 H, $-\text{C}_1$ - C_8 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하고 이로 제한되지 않는 4개 이하의 기로 치환될 수 있다:



[0229]

[0230] "아릴알킬"은 탄소 원자 (통상적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자)에 결합한 수소 원자 중의 하나가 아릴 라디칼로 대체된 비환식 알킬 라디칼을 의미한다. 대표적인 아릴알킬기는 벤질, 2-페닐에탄-1-일, 2-페닐에텐-1-일, 나프틸메틸, 2-나프틸에탄-1-일, 2-나프틸에텐-1-일, 나프토벤질, 2-나프토펜에탄-1-일 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 아릴알킬기는 6 내지 20개의 탄소 원자를 포함하고, 예를 들어 알카닐, 알케닐 또는 알키닐기를 포함하는, 아릴알킬기의 알킬 모이어티는 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함하고, 아릴 모이어티는 5 내지 14개의 탄소 원자를 포함한다.

[0231] "헤테로아릴알킬"은 탄소 원자, 통상적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자에 결합한 수소 원자 중의 하나가 헤테로아릴 라디칼로 대체된 비환식 알킬 라디칼을 의미한다. 통상적인 헤테로아릴알킬기는 2-벤즈이미다졸릴메틸, 2-푸릴에틸 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 헤테로아릴알킬기는 탄소 원자 6 내지 20개를 포함하며, 예를 들어, 알카닐, 알케닐 또는 알키닐기를 포함하는, 헤테로아릴알킬기의 알킬 모이어티는 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함하고 헤테로아릴 모이어티는 5 내지 14개의 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 포함한다. 헤테로아릴알킬기의 헤테로아릴 모이어티는 3 내지 7원의 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개) 또는 7 내지 10원의 바이사이클 (탄소 원자 4 내지 9개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개), 예를 들어 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다.

[0232] 본원에 사용되는 용어 "전구약물"은 모 화합물 또는 약물에 비해 세포에 대한 세포독성이 작을 수 있고 효소에 의해 또는 가수분해에 의해 활성화되거나 보다 활성의 모 형태로 전환될 수 있는, 본 발명의 화합물의 전구체 또는 유도체 형태를 의미한다 (예를 들어, [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical

Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)] 참조). 본 발명의 전구약물은 보다 활성인 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는 포스포이트-함유 전구약물, 티오포스포이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형 전구약물, 글리코실화 전구약물, 베타-락탐-함유 전구약물, 임의 치환된 페녹시아세타미드-함유 전구약물, 임의 치환된 페닐아세타미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기한 본 발명의 화합물 및 화학요법제를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0233] "대사물질"은 특정 화합물 또는 그의 염의 신체 내의 대사를 통해 생산된 산물이다. 화합물의 대사물질은 당업계에 공지된 통상적인 기술을 사용하여 확인할 수 있고, 그 활성은 본원에서 설명되는 바와 같은 시험을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 산물은 예를 들어 투여된 화합물의 산화, 환원, 가수분해, 아미드화, 탈아미드화, 에스테르화, 탈에스테르화, 효소에 의한 절단 등에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 그의 대사 산물 생성에 충분한 시간 동안 포유동물과 접촉시키는 것을 포함하는 과정에 의해 생산된 화합물을 포함하는, 본 발명의 화합물의 대사물질을 포함한다.

[0234] "리포좀"은 약물을 포유동물에게 전달하기 위해 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 리포좀의 성분들은 통상적으로 생물학적 막의 지질 배열에 유사한 2층 구조로 배열된다.

[0235] "링커"는 공유결합을 포함하는 화학적 모이어티 또는 항체를 약물 모이어티에 공유결합에 의해 부착시키는 원자의 사슬을 의미한다. 다양한 실시태양에서, 링커는 알킬디일, 아릴디일, 헤테로아릴디일과 같은 이가 라디칼, 알킬옥시의 반복 단위 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (예를 들어, 폴리에틸렌옥시, PEG, 폴리메틸렌옥시), 및 알킬아미노 (예를 들어, 폴리에틸렌아미노, 제프아민 (JeffamineTM))와 같은 모이어티; 및 숙시네이트, 숙신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트, 및 카프로아미드를 포함하는 이산 에스테르 및 아미드를 포함한다.

[0236] 용어 "키랄"은 거울상 파트너에 겹쳐질 수 없는 특성을 갖는 분자를 의미하고, 용어 "아키랄"은 그의 거울상 파트너에 겹쳐질 수 있는 분자를 의미한다.

[0237] 용어 "입체 이성질체"는 동일한 화학적 구성을 가지나, 공간의 원자 또는 기의 배열에서 상이한 화합물을 의미한다.

[0238] "부분 입체 이성질체"는 2 이상의 키랄 중심이 있고 이들 분자가 서로 거울상이 아닌 입체 이성질체를 의미한다. 부분 입체 이성질체는 상이한 물리적 특성, 예를 들어, 용점, 비점, 스펙트럼 성질, 및 반응성을 갖는다. 부분 입체 이성질체의 혼합물은 전기영동 및 크로마토그래피와 같은 고 분해능 분석 과정 하에 분리될 수 있다.

[0239] "거울상 이성질체"는 서로 겹쳐질 수 없는 거울상인 두개의 입체 이성질체 화합물을 의미한다.

[0240] 본원에서 사용된 입체화학 정의 및 규약은 일반적으로 문헌 ([S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York]; 및 [Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc. New York])을 따른다. 많은 유기 화합물은 광학 활성 형태로 존재한다. 즉, 이들은 평면 편광의 평면을 회전하는 능력을 가진다. 광학 활성 화합물을 설명함에 있어서, 접두사 D 및 L, 또는 R 및 S는 그의 키랄 중심(들)에 대해 분자의 절대적 입체형태를 표시하기 위해 사용된다. 접두사 d 및 l 또는 (+) 및 (-)은 화합물에 의한 평면 편광 회전 표시를 나타내기 위해 사용되는데, (-) 또는 l은 화합물이 좌선성임을 의미한다. 접두사 (+) 또는 d로 표시된 화합물은 우선성이다. 주어진 화학적 구조에서, 이 입체 이성질체는 이들이 서로 거울상이라는 것만 제외하고는 동일하다. 특정 입체 이성질체는 또한 거울상 이성질체로 불릴 수 있고, 이러한 이성질체의 혼합물은 종종 거울상 이성질체 혼합물로 불린다. 거울상 이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로 불리는데, 이들은 화학적 반응 또는 과정에 있어, 임의의 입체선택성 또는 입체특이성도 존재하지 않은 경우가 있을 수 있다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는, 두개의 거울상 이성질체 종의 등몰 혼합물을 의미한다.

[0241] 용어 "호변 이성질체" 또는 "호변 이성질체 형태"는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호 전환될 수 있는 상이한 에너지의 구조 이성질체를 의미한다. 예를 들어, 양성자 호변 이성질체 (양성자성 (prototropic) 호변 이성질체로도 알려짐)는 양성자의 이동을 통한 상호전환, 예를 들어 케토-에놀 및 이민-엔아민 이성체화를 포함한다. 원자가 (valence) 호변 이성질체는 결합 전자의 일부의 재구성에 의해 상호전환을 포함한다.

[0242] 구문 "제약상 허용되는 염"은 본원에서 사용될 때 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 유기 또는 무기 염을 의

미한다. 예시적인 염은 술페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 니트레이트, 비술페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레에이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄술포네이트 "메실레이트", 에탄술포네이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 및 파모에이트 (즉, 1,1'-메틸렌-비스(2-히드록시-3-나프토에이트)) 염을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 제약상 허용되는 염은 다른 분자, 예를 들어 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 다른 반대 이온의 도입을 수반할 수 있다. 반대 이온은 모 화합물의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 제약상 허용되는 염은 그의 구조 내에 2 이상의 하전 원자를 가질 수 있다. 다수의 하전 원자가 제약상 허용되는 염의 일부인 경우에는 다수의 반대 이온을 가질 수 있다. 따라서, 제약상 허용되는 염은 하나 이상의 하전 원자 및/또는 하나 이상의 반대 이온을 가질 수 있다.

[0243] 본 발명의 화합물이 염기이면, 목적하는 제약상 허용되는 염은 당업계에서 이용가능한 임의의 적합한 방법, 예를 들어 유리 염기의 무기산, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 메탄술포산, 인산 등, 또는 유기산, 예를 들어 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레산, 숙신산, 만델산, 푸마르산, 말론산, 피루브산, 옥살산, 글리콜산, 살리실산, 피라노시드산, 예를 들어 글루쿠론산 또는 갈락투론산, 알파 히드록시산, 예를 들어 시트르산 또는 타르타르산, 아미노산, 예를 들어 아스파르트산 또는 글루탐산, 방향족 산, 예를 들어 벤조산 또는 신남산, 술포산, 예를 들어 p-톨루엔술포산 또는 에탄술포산 등의 처리에 의해 제조될 수 있다.

[0244] 본 발명의 화합물이 산이면, 목적하는 제약상 허용되는 염은 임의의 적합한 방법, 예를 들어 유리 산의 무기 또는 유기 염기, 예를 들어 아민 (1차, 2차 또는 3차), 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 등의 처리에 의해 제조될 수 있다. 적합한 염의 예는 아미노산, 예를 들어 글리신 및 아르기닌, 암모니아, 1차, 2차 및 3차 아민, 및 시클릭 아민, 예를 들어 피페리딘, 모르폴린 및 피페라진으로부터 유도된 유기 염, 및 나트륨, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연, 알루미늄 및 리튬으로부터 유도된 무기 염을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0245] 구문 "제약상 허용되는"은 물질 또는 조성물이 제제를 구성하는 다른 성분, 및/또는 그로 치료되는 포유동물과 화학적으로 및/또는 독성학적으로 상용성이어야 함을 나타낸다.

[0246] "용매화물"은 하나 이상의 용매 분자와 본 발명의 화합물의 회합체 또는 복합체를 의미한다. 용매화물을 형성하는 용매의 예는 물, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산, 및 에탄올아민을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 용어 "수화물"은 용매 분자가 물인 복합체를 의미한다.

[0247] 용어 "보호기"는 화합물 상의 다른 관능기와 반응하면서 특정 관능기를 차단 또는 보호하기 위해 통상적으로 사용되는 치환기를 의미한다. 예를 들어, "아미노-보호기"는 화합물 내의 아미노 관능기를 차단 또는 보호하는, 아미노기에 부착된 치환기이다. 적합한 아미노-보호기는 아세틸, 트리플루오로아세틸, t-부톡시카르보닐 (BOC), 벤질옥시카르보닐 (CBZ) 및 9-플루오레닐메틸렌옥시카르보닐 (Fmoc)을 포함한다. 유사하게, "히드록시-보호기"는 히드록시 관능기를 차단 또는 보호하는, 히드록시기의 치환기를 의미한다. 적합한 보호기는 아세틸 및 실릴을 포함한다. "카르복시-보호기"는 카르복시 관능기를 차단 또는 보호하는, 카르복시기의 치환기를 의미한다. 통상적인 카르복시-보호기는 페닐술포닐에틸, 시아노에틸, 2-(트리메틸실릴)에틸, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸, 2-(p-톨루엔술포닐)에틸, 2-(p-니트로페닐술포닐)에틸, 2-(디페닐포스포노)-에틸, 니트로에틸 등을 포함한다. 보호기 및 그의 용도에 대한 일반적인 설명에 대해서는, 문헌 [T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991]을 참조한다.

[0248] "이탈기"는 또다른 관능기에 의해 치환될 수 있는 관능기를 의미한다. 이러한 이탈기는 당업계에 잘 알려져 있으며, 그 예는 할라이드 (예, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드), 메탄술포닐 (메실), p-톨루엔술포닐 (토실), 트리플루오로메틸술포닐 (트리플레이트), 및 트리플루오로메틸술포네이트를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0249] 약어

[0250] 링커 성분:

[0251] MC = 6-말레이미도카프로일

[0252] Val-Cit 또는 "vc" = 발린-시트룰린 (프로테아제 절단가능 링커 내의 예시적인 디펩티드)

- [0253] 시트룰린 = 2-아미노-5-우레이도 펜탄산
- [0254] PAB = p-아미노벤질옥시카르보닐 ("자가 희생적 (self immolative)" 링커 성분의 예)
- [0255] Me-Val-Cit = N-메틸-발린-시트룰린 (여기서, 링커 펩티드 결합은 카텝신 B에 의한 그의 절단을 방지하기 위해 변형됨)
- [0256] MC(PEG)6-OH = 말레이미도카프로일-폴리에틸렌 글리콜 (항체 시스테인에 부착될 수 있음)
- [0257] 세포독성 약물:
- [0258] MMAE = 모노-메틸 아우리스타틴 E (MW 718)
- [0259] MMAF = 약물의 C-말단에 페닐알라닌이 존재하는 아우리스타틴 E의 변이체 (MMAE) (MW 731.5)
- [0260] MMAF-DMAEA = DMAEA (디메틸아미노에틸아민)가 C-말단 페닐알라닌에 아마이드 연결된 MMAF (MW 801.5)
- [0261] MMAF-TEG = 테트라에틸렌 글리콜이 페닐알라닌에 에스테르화된 MMAF
- [0262] MMAF-NtBu = MMAF의 C-말단에 아마이드로서 부착된 N-t-부틸
- [0263] DM1 = N(2')-데아세틸-N(2')-(3-머캅토-1-옥소프로필)-메이탄신
- [0264] DM3 = N(2')-데아세틸-N2-(4-머캅토-1-옥소펜틸)-메이탄신
- [0265] DM4 = N(2')-데아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신
- [0266] 추가의 약어는 다음과 같다: AE는 아우리스타틴 E, Boc는 N-(t-부톡시카르보닐), cit는 시트룰린, dap는 돌라프로인, DCC는 1,3-디시클로헥실카르보다이미드, DCM은 디클로로메탄, DEA는 디에틸아민, DEAD는 디에틸아조디카르복실레이트, DEPC는 디에틸포스포릴시아니데이트, DIAD는 디이소프로필아조디카르복실레이트, DIEA는 N,N-디이소프로필에틸아민, dil는 돌라이소류신, DMA는 디메틸아세트아미드, DMAP는 4-디메틸아미노피리딘, DME는 에틸렌글리콜 디메틸 에테르 (또는 1,2-디메톡시에탄), DMF는 N,N-디메틸포름아미드, DMSO는 디메틸설폭사이드, doe는 돌라페닌, dov는 N,N-디메틸발린, DTNB는 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산), DTPA는 디에틸렌트리아민펜타아세트산, DTT는 디티오프레일, EDCI는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보다이미드 염산염, EEDQ는 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린, ES-MS는 전자 분사 질량분석법, EtOAc는 에틸 아세테이트, Fmoc는 N-(9-플루오렌릴메톡시카르보닐), gly는 글리신, HATU는 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트, HOBt는 1-히드록시벤조트리아졸, HPLC는 고압 액체 크로마토그래피, ile는 이소류신, lys는 리신, MeCN(CH₃CN)는 아세토니트릴, MeOH는 메탄올, Mtr는 4-아니실디페닐메틸 (또는 4-메톡시트리틸), nor는 (1S,2R)-(+)-노르에페드린, PBS는 포스페이트 완충 염수 (pH 7.4), PEG는 폴리에틸렌 글리콜, Ph는 페닐, Pnp는 p-니트로페닐, MC는 6-말레이미도카프로일, phe는 L-페닐알라닌, PyBrop는 브로모 트리소-피롤리디노 포스포늄 헥사플루오로포스페이트, SEC는 크기 배제 크로마토그래피, Su는 숙신이미드, TFA는 트리플루오로아세트산, TLC는 박막 크로마토그래피, UV는 자외선, 및 val는 발린이다.
- [0267] "유리 시스테인 아미노산"은 모 항체 내로 조작되고, 티올 관능기 (-SH)를 갖고, 분자내 또는 분자간 디설피드 다리로서 페어링되지 않는 시스테인 아미노산 잔기를 의미한다.
- [0268] 용어 "티올 반응성 값"은 유리 시스테인 아미노산의 반응성에 대한 정량적 특성이다. 티올 반응성 값은 티올-반응성 시약과 반응하는, 시스테인 조작된 항체 내의 유리 시스테인 아미노산의 비율이고, 최대 1의 값으로 전환된다. 예를 들어, 100% 수율로 티올-반응성 시약, 예를 들어 비오틴-말레이미드 시약과 반응하여 비오틴-표지된 항체를 형성하는, 시스테인 조작된 항체 상의 유리 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 1.0이다. 80% 수율로 티올-반응성 시약과 반응하는, 동일한 또는 상이한 모 항체 내로 조작된 다른 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0.8이다. 티올-반응성 시약과 전혀 반응하지 못하는, 동일한 또는 상이한 모 항체 내로 조작된 다른 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0이다. 특정 시스테인의 티올 반응성 값 결정은 ELISA 분석, 질량 분광분석, 액체 크로마토그래피, 자가방사선촬영, 또는 다른 정량 분석 시험에 의해 수행할 수 있다.
- [0269] "모 항체"는 그로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 시스테인 잔기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 모 항체는 천연 또는 야생형 서열을 포함할 수 있다. 모 항체는 다른 천연, 야생형, 또는 변형된 형태의 항체에 비해 기존재하는 아미노산 서열 변형 (예를 들어 부가, 결실 및/또는 치환)을 가질 수 있다. 모 항체는 목적하는 표적 항원, 예를 들어 생물학상 중요한 폴리펩티드에 대해 작용할 수 있다. 또한,

비폴리캡티드 항원 (예를 들어 종양-결합 당지질 항원; US 5091178 참조)에 대해 작용하는 항체도 고려된다.

표 1

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* 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 */
/* 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,-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},
/* I */ {-1,-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},
/* 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,0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* 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,-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},
/* 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},
/* 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},
/* Y */ {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,10,-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}
};

```

[0270]

```

/*
*/
#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();

```

[0271]

```

/* 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 jmps */
    readjmps();          /* get the actual jmps */
    print();              /* print stats, alignment */

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

```

main

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * 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()
{
    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 */
    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));
    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 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    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;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

[0273]


```

...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

```

[0274]

```

else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
} else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    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) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            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) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}

tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}

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

(void) free((char *)col1);
}

```

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * 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()
 * 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 */

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

print()
{
    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);
    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;
    }
    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;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

[0276]

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
{
    int      lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    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;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[ *p0-'A' ] & xbm[ *p1-'A' ])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].n[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].n[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* 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;
    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);
}

```

getmat

[0277]

```

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(namex[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];
    }
}

```

...getmat

pr_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *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?
             */
            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]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nm = 0;
    }
}
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

```

...dumpblock
(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()
 */
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 = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '\t')
            *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';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

[0280]


```

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
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

```

...putline

```

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */

```

static

stars()

{

```

    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--)
        *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++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '!';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '0';
}

```

stars

[0281]

```

/*
 * 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) strepy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

[0282]

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * 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;
int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    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);
    }
    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++;
    }
    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';
}

```

cleanup

getseq

[0283]

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
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);
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}
char *
g_calloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
    if (!i) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            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--)
                ;

```

...getseq

g_calloc

readjmps

[0284]

```

...readjumps
    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].jmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment'n", prog);
    cleanup(1);
}
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 */
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;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}
}

```

[0285]

```

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

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

```

[0286]

[0287]

III. 본 발명의 조성물 및 방법

[0288]

본 발명은 항-CD79b 항체 또는 그의 기능성 단편, 및 조혈계 종양의 치료에서 그의 사용 방법을 제공한다.

[0289]

한 측면에서, 본 발명은 상기하거나 아래에서 설명되는 임의의 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 임의로, 항체는 그의 각각의 항원 에피토프에 대한 항-CD79b 폴리펩티드 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 모노클로날 항체, 항체 단편, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 디아바디, 단일 도메인 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일쇄 항체 또는 항체이다. 본 발명의 항체는 성장 억제제 또는 세

포독성제, 예를 들어 독소, 예를 들어, 아우리스타틴, 메이탄시노이드, 돌로스타틴 유도체 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 핵산분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의로 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있고, 바람직하게는 항체가 결합하는 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 검출 목적을 위해, 본 발명의 항체는 검출가능하게 표지되거나 고체 지지체 등에 부착될 수 있다.

[0290] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 항체의 일가 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 Fab 단편으로서 항체의 친화도)가 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지는 무린 항체 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 무린 항체의 친화도) 또는 키메라 항체 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 키메라 항체의 친화도)의 일가 친화도와 실질적으로 동일한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0291] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 항체의 일가 친화도 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 항체의 친화도)가 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지는 무린 항체 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 무린 항체의 친화도) 또는 키메라 항체 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 키메라 항체의 친화도)의 일가 친화도보다 더 낮은, 예를 들어 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60배 더 낮은 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0292] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 항체의 일가 친화도 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 항체의 친화도)가 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지는 무린 항체 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 무린 항체의 친화도) 또는 키메라 항체 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 키메라 항체의 친화도)의 일가 친화도보다 더 큰, 예를 들어 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 더 큰 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0293] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지는, 그의 이가 형태에서 무린 항체 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도) 또는 키메라 항체 (예를 들어, Fab 단편으로서 CD79b에 대한 키메라 항체의 친화도)의 친화도와 실질적으로 동일한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0294] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지는, 그의 이가 형태에서 무린 항체 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도) 또는 키메라 항체 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG 단편으로서 키메라 항체의 친화도)의 친화도보다 더 낮은, 예를 들어 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60배 더 낮은 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0295] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지는, 그의 이가 형태에서 무린 항체 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도) 또는 키메라 항체 (예를 들어 CD79b에 대한 IgG 단편으로서 키메라 항체의 친화도)의 친화도보다 더 큰, 예를 들어 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 더 큰 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0296] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.4 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 추가의 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.4 nM +/- 0.04인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0297] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.3 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.32 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.36 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.4 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.44 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.48 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.5 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.3 nM 내지 0.5 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.32 nM 내지 0.48 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.36 nM 내지 0.44 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0298] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.2 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 추가의 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.2 nM +/- 0.02인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[illegible]

[0300] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.5 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 추가의 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.5 nM +/- 0.1인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0301] 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.4 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에

대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.5 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.6 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.7 nM 또는 이보다 우수한 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.3 nM 내지 0.7 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.4 nM 내지 0.6 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 이가 형태의 항체의 친화도 (예를 들어, CD79b에 대한 IgG로서 항체의 친화도)가 0.5 nM 내지 0.55 nM인 인간화 항-CD79b 항체를 제공한다.

[0302] 한 측면에서, CD79b에 대한 무린 항체의 일가 친화도는 서열 10 (도 7a-b) 및 서열 14 (도 8a-b)의 가변 도메인 서열을 포함하는 Fab 단편의 결합 친화도와 실질적으로 동일하다. 다른 측면에서, CD79b에 대한 무린 항체의 일가 친화도는 1993년 7월 20일자로 ATCC에 HB11413으로 기탁된 하이브리도마로부터 생성된 항체의 가변 도메인 서열을 포함하는 Fab 단편, 또는 1993년 7월 20일자로 ATCC에 HB11413으로 기탁된 하이브리도마로부터 생성된 항체로부터의 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체의 결합 친화도와 실질적으로 동일하다.

[0303] 당업계에 잘 확립된 바와 같이, 리간드의 그의 수용체에 대한 결합 친화도는 임의의 다양한 분석을 사용하여 결정할 수 있고, 다양한 정량적 값으로 표현될 수 있다. 따라서, 한 실시태양에서, 결합 친화도는 Kd 값으로 표현되고, 고유한 결합 친화도 (예를 들어, 최소 결합력 (avidity) 효과를 갖는)를 반영한다. 일반적으로 및 바람직하게는, 결합 친화도는 세포 부재 또는 세포-연관 환경에서 시험관 내에서 측정된다. 본원에 보다 상세히 설명하는 바와 같이, 결합 친화도의 배수 차이는 인간화 항체 (예를 들어, Fab 형태로)의 일가 결합 친화도 값 및 참조/비교 항체 (예를 들어, Fab 형태로) (예를 들어, 공여체 추가변 영역 서열을 갖는 무린 항체)의 일가 결합 친화도 값의 비로서 정량될 수 있고, 여기서 결합 친화도 값은 유사한 분석 조건 하에 결정된다. 따라서, 한 실시태양에서, 결합 친화도의 배수 차이는 Fab 형태의 인간화 항체 및 상기 참조/비교 Fab 항체의 Kd 값의 비로서 결정된다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 본 발명의 항체 (A)가 참조 항체 (M)의 친화도보다 "3배 더 낮은" 친화도를 가지면, A에 대한 Kd 값이 3x인 경우에, M의 Kd 값은 1x이고, A의 Kd 대 M의 Kd의 비는 3:1일 것이다. 이와 반대로, 한 실시태양에서, 본 발명의 항체 (C)가 참조 항체 (R)의 친화도보다 "3배 더 큰" 친화도를 가지면, C에 대한 Kd 값이 1x인 경우에, R에 대한 Kd 값은 3x이고, C의 Kd 대 R의 Kd의 비는 1:3일 것이다. 본원에서 설명되는 것을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 많은 분석, 예를 들어 Biacore, 방사면역분석법 (RIA) 및 ELISA를 사용하여 결합 친화도 측정을 수행할 수 있다.

[0304] 한 측면에서,

[0305] (a) (i) 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1 (여기서, A1-A15는 KASQSVDDYDGSFLN (서열 131)임),

[0306] (ii) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 (여기서, B1-B7은 AASNLES (서열 132)임),

[0307] (iii) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 (여기서, C1-C9는 QQSNEPLT (서열 133)임),

[0308] (iv) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 (여기서, D1-D10은 GYTFSSYWIE (서열 134)임),

[0309] (v) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 (여기서, E1-E18은 GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)임), 및

[0310] (vi) 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3 (여기서, F1-F10은 TRRVVPVYFDY (서열 136)임)

[0311] 으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는, CD79b에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-L1은 서열 131의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-L2는 서열 132의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-L3은 서열 133의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-H1은 서열 134의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-H2는 서열 135의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-H3은 서열 136의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 이들 서열을 (본원에서 설명되는 바와 같이 조합하여) 포함하는 본 발명의 항체는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0312] 한 측면에서,

[0313] (a) (i) 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1 (여기서, A1-A15는 KASQSVDDYDGSFLN (서열 131)임),

- [0314] (ii) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 (여기서, B1-B7은 AASNLES (서열 132)임),
- [0315] (iii) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 (여기서, C1-C9는 QQSNEPLT (서열 133)임),
- [0316] (iv) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 (여기서, D1-D10은 GYTFSSYWIE (서열 134)임),
- [0317] (v) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 (여기서, E1-E18은 GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)임), 및
- [0318] (vi) 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3 (여기서, F1-F10은 TRRVVYFDY (서열 136)임)으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR; 및
- [0319] (b) 서열 131, 132, 133, 134, 135 또는 136에 제시된 서열의 적어도 하나의 잔기의 변형을 포함하는 적어도 하나의 변이체 HVR
- [0320] 을 포함하는, CD79b에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-L1은 서열 131의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-L2는 서열 132의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-L3은 서열 133의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-H1은 서열 134의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-H2는 서열 135의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 HVR-H3은 서열 136의 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 이들 서열을 (본원에서 설명되는 바와 같이 조합하여) 포함하는 본 발명의 항체는 인간화 또는 인간 항체이다.
- [0321] 한 측면에서, 본 발명은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항체를 제공하고, 여기서 각각의 HVR은 서열 131, 132, 133, 134, 135, 및 136으로 이루어지는 군 중에서 선택된 서열을 포함하거나, 이 서열로 이루어지거나, 이 서열로 본질적으로 이루어지고, 서열 131은 HVR-L1에 대응하고, 서열 132는 HVR-L2에 대응하고, 서열 133은 HVR-L3에 대응하고, 서열 134는 HVR-H1에 대응하고, 서열 135는 HVR-H2에 대응하고, 서열 136은 HVR-H3에 대응한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 이들은 각각 순서대로 서열 131, 132, 133, 134, 135 및 136을 포함한다.
- [0322] 본 발명의 항체에서 변이체 HVR은 HVR 내의 하나 이상의 잔기의 변형을 가질 수 있다. 한 실시태양에서, HVR-L1 변이체는 위치 A4 (K), A9 (E 또는 S) 및 A10 (A 또는 S)에 하나의 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, HVR-L2 변이체는 위치 B2 (S 또는 G), B3 (R 또는 G), B4 (K, R, Y, I, H 또는 Q), B5 (R), B6 (G, K, A, R, S 또는 L) 및 B7 (R, N, T 또는 G) 중의 임의의 하나 또는 조합된 위치에 1-5 (1, 2, 3, 4, 또는 5) 개의 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, HVR-L3 변이체는 위치 C1 (N 또는 D), C2 (N 또는 P), C3 (D 또는 R), C5 (S, K, A, Q, D, L 또는 G), C6 (A, E 또는 N), C7 (A), C8 (R) 및 C9 (N) 중의 임의의 하나 또는 조합된 위치에서 1-4 (1, 2, 3 또는 4) 개의 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, HVR-H1 변이체는 위치 D1 (P), D2 (F), D3 (P, S, Y, G 또는 N), D4 (L 또는 V), D5 (T, R, N, K, C, G 또는 P), D6 (R, T, K 또는 G), D8 (F), D9 (V 또는 L) 및 D10 (S, Q, N 또는 D) 중의 임의의 하나 또는 조합된 위치에서 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7) 개의 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, HVR-H3 변이체는 위치 F4 (R 또는 I), F6 (I 또는 F), F7 (K, C, R, V 또는 F), F8 (L), 및 F9 (S) 중의 임의의 하나 또는 조합된 위치에서 1-3 (1, 2 또는 3) 개의 치환을 포함한다. 각각의 위치 다음의 괄호 내의 문자(들)은 예시적인 치환 (즉, 교체) 아미노산을 나타내고; 당업자에게 명백할 바와 같이, 본원에서 설명되는 맥락에서 다른 아미노산의 치환 아미노산으로서의 적합성은 당업계에 공지된 및/또는 본원에서 설명된 기술을 사용하여 통상적으로 평가될 수 있다. 한 실시태양에서, 변이체 HVR-L1에서 A9는 E이다. 한 실시태양에서, 변이체 HVR-H3에서 F6은 I이다. 한 실시태양에서, 변이체 HVR-H3에서 F7은 R이다. 한 실시태양에서, 변이체 HVR-H3에서 F8은 L이다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 F6이 I이고, F7이 R이고, F8이 L인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 A9가 E인 변이체 HVR-L1, 및 F6이 I이고, F7이 R이고 F8이 L인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시태양에서, 변이체 HVR-L1에서 A9는 S이다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 A9가 S인 변이체 HVR-L1, 및 F6이 I이고, F7이 R이고, F8이 L인 변이체 HVR-H3을 포함한다.
- [0323] 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 A4가 K인 변이체 HVR-L1을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L1은 각각 서열 132, 133, 134, 135 및 136에 제시된 서열을 순서대로 포함하는 HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L1 항체는 A9가 E 또는 S 및/또는 A10이 A 또는 S인 HVR-L1 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L1 항체는 C6이 E 또는 N 및/또는 C7이 A인 HVR-L3 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 71은 A이고, 73은 T이고/이거

나, 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 및/또는 80에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 48은 I이고, 67은 A이고, 69는 F이고, 71은 A이고, 73은 T이고, 75는 S이고, 78은 A이고/이거나 80은 M이다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다.

[0324]

한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 B3이 R이고, B4가 K이고, B6이 G이고, B7이 R인 변이체 HVR-L2를 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 B3이 R이고, B4가 Y이고, B6이 K이고, B7이 R인 변이체 HVR-L2를 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 B3이 R이고, B4가 K이고, B6이 G인 변이체 HVR-L2를 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L2 항체는 각각 서열 131, 133, 134, 135 및 136에 제시된 서열을 순서대로 포함하는 HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L2 항체는 A9가 E 또는 S이고/이거나 A10이 A 또는 S인 HVR-L1 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L2 항체는 C6이 E 또는 N이고/이거나 C7이 A인 HVR-L3 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 71은 A이고, 73은 T이고/이거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 및/또는 80에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 48은 I이고, 67은 A이고, 69는 F이고, 71은 A이고, 73은 T이고, 75는 S이고, 78은 A이고/이거나 80은 M이다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다.

[0325]

한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 C5가 K인 변이체 HVR-L3을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 C5가 S인 변이체 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L3 항체는 각각 서열 131, 132, 134, 135 및 136에 제시된 서열을 순서대로 포함하는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L3 항체는 A9가 E 또는 S이고/이거나 A10이 A 또는 S인 HVR-L1 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-L3 항체는 C6이 E 또는 N이고/이거나 C7이 A인 HVR-L3 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 71은 A이고, 73은 T이고/이거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 및/또는 80에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 48은 I이고, 67은 A이고, 69는 F이고, 71은 A이고, 73은 T이고, 75는 S이고, 78은 A이고/이거나 80은 M이다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다.

[0326]

한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 D3이 P이고, D5가 T이고, D6이 R이고, D10이 N인 변이체 HVR-H1을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 D3이 P이고, D5가 N이고, D6이 R이고, D10이 N인 변이체 HVR-H1

을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-H1 항체는 각각 서열 131, 132, 133, 135 및 136에 제시된 서열을 순서대로 포함하는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H2 및 HVR-H3을 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-H1 항체는 A9가 E 또는 S이고/이거나 A10이 A 또는 S인 HVR-L1 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-H1 항체는 C6이 E 또는 N이고/이거나 C7이 A인 HVR-L3 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 71은 A이고, 73은 T이고/이거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 및/또는 80에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 48은 I이고, 67은 A이고, 69는 F이고, 71은 A이고, 73은 T이고, 75는 S이고, 78은 A이고/이거나 80은 M이다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 상기 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다.

[0327]

한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 F6이 I이고, F8이 L인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 F6이 I이고, F7이 R이고, F8이 L인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-H3 항체는 각각 서열 131, 132, 133, 134 및 135에 제시된 서열을 순서대로 포함하는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 및 HVR-H2를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-H3 항체는 A9가 E 또는 S이고/이거나 A10이 A 또는 S인 HVR-L1 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 변이체 HVR-H3 항체는 C6이 E 또는 N이고/이거나 C7이 A인 HVR-L3 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 71은 A이고, 73은 T이고/이거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 48은 I이고, 67은 A이고, 69는 F이고, 71은 A이고, 73은 T이고/이거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 및/또는 80에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 48은 I이고, 67은 A이고, 69는 F이고, 71은 A이고, 73은 T이고, 75는 S이고, 78은 A이고/이거나 80은 M이다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 상기 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 실시태양에서, 프레임워크 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시태양에서, 위치 (인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열의) 4는 L이고/이거나 47은 F이다.

[0328]

한 측면에서, 본 발명은 도 9 (서열 17-21) 및/또는 도 10 (서열 22-106)에 제시된 HVR 서열 중의 1, 2, 3, 4, 5개 또는 전부를 포함하는 항체를 제공한다.

[0329]

숙주 대상체에서 사용하기 위한 치료제는 바람직하게는 상기 대상체에서 치료제에 대한 면역 반응을 거의 또는 전혀 유발하지 않는다. 한 실시태양에서, 본 발명은 이와 같은 물질을 제공한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 본 발명은 숙주 대상체에서 서열 10 & 14의 서열을 포함하는 항체에 비해 실질적으로 감소된 수준으로 인간 항-마우스 항체 반응 (HAMA)을 유발하고/하거나 유발할 것으로 예상되는 인간화 항체를 제공한다. 다른 예에서, 본 발명은 인간 항-마우스 항체 반응 (HAMA)을 최소로 유발하거나 전혀 유발하지 않거나, 또는 상기 반응을 최소로 유발하거나 전혀 유발하지 않을 것으로 예상되는 인간화 항체를 제공한다. 한 예에서, 본 발명의 항체는 항-마우스 항체 반응을 임상적으로 허용되는 수준으로 또는 상기 수준보다 작은 수준으로 유발한다.

- [0330] 본 발명의 인간화 항체는 그의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인에 하나 이상의 인간 및/또는 인간 컨센서스 비-초가변 영역 (예를 들어, 프레임워크) 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 추가의 변형은 인간 및/또는 인간 컨센서스 비-초가변 영역 서열 내에 존재한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 중쇄 가변 도메인은 한 실시태양에서 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열인 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 적어도 하나의 아미노산 위치에서 변형된 변이체 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 변이체 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열은 위치 71, 73 및/또는 78 중의 하나 이상에서 치환을 포함할 수 있다. 한 실시태양에서, 상기 치환은 R71A, N73T 및/또는 L78A의 임의의 조합이다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 변이체 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 치환은 V48I, F67A, I69F, R71A, N73T 및/또는 L78A이다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 변이체 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 및/또는 80에서 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 치환은 V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A 및/또는 L80M이다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 경쇄 가변 도메인은 한 실시태양에서 κ I 컨센서스 프레임워크 서열인 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 적어도 하나의 아미노산 위치에서 변형된 변이체 κ I 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 변이체 κ I 컨센서스 프레임워크 서열은 위치 4에서 치환을 포함할 수 있다. 한 실시태양에서, 상기 치환은 M4L이다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 변이체 κ I 컨센서스 프레임워크 서열은 위치 4 및/또는 47에서 치환을 포함할 수 있다. 한 실시태양에서, 상기 치환은 M4L 및/또는 L47F이다.
- [0331] 당업계에 공지되어 있고, 본원에서 아래에 보다 상세히 설명하는 바와 같이, 항체의 초가변 영역을 묘사하는 아미노산 위치/경계는 문맥 및 당업계에 공지된 다양한 정의 (아래 설명된 바와 같은)에 따라 상이할 수 있다. 가변 도메인 내의 일부 위치는, 이들 위치가 한 기준 세트 하에서는 초가변 영역 내에 위치할 수 있지만 다른 기준 세트 하에서는 초가변 영역 외부에 존재하는 것으로 볼 수 있기 때문에, 혼성 초가변 위치로서 간주될 수 있다. 또한, 하나 이상의 상기 위치는 연장된 초가변 영역 (아래에서 추가로 설명되는 바와 같은)에서 볼 수 있다. 본 발명은 상기 혼성 초가변 위치에 변형을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 상기 초가변 위치는 중쇄 가변 도메인 내에 하나 이상의 위치 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 및 101-102를 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 혼성 초가변 위치는 경쇄 가변 도메인 내에 하나 이상의 위치 24-29, 35-36, 46-49, 56 및 97을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 혼성 초가변 위치에서 변형된 인간 변이체 인간 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다.
- [0332] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 위치 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 및 101 중의 하나 이상에서 변형된 변이체 인간 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 G26P 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 F27Y 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 T28P, S, Y, G 또는 N 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 F29L 또는 F29V 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 S30T, R, N, K, C, G 또는 P 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 A33W 또는 A33F 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 M34I, V 또는 L 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 S35E, Q, N 또는 D 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 V48I 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 S49G 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 Y58N 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 A60N 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 D61E 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 S62I 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 V63F 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 A93T 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 D101S 치환을 포함한다.
- [0333] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 위치 24, 27-29, 56 및 97 중의 하나 이상에서 변형된 변이체 인간 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 R24K 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 Q27K 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 S28D 또는 E 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 I29G, A 또는 S 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 S56R, N, T 또는 G 치환을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 T97N 치환을 포함한다.
- [0334] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 위치 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 및 101 중의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16개 또는 전부에서 변형된 변이체 인간 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 변형은 G26P, F27Y, T28P (S, Y, G 또는 N), F29L (V), S30T (R, N, K, C, G 또는 P), A33W (F), M34I (V 또는 L), S35E (Q, N 또는 D), V48I, S49G, Y58N, A60N, D61E, S62I, V63F, A93T 및 D101S로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 본 발명의 일부 실시태양에

서, 본 발명의 항체는 위치 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 및/또는 80에서 변형된 변이체 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 치환은 V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A 및/또는 L80M이다.

[0335] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 위치 24, 27-29, 56 및 97 중의 1, 2, 3, 4, 5개 또는 전부에서 변형된 변이체 인간 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 변형은 R24K, Q27K, S28D (E), I29G (A 또는 S), S56R (N, T 또는 G) 및 T97N으로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 본 발명의 일부 실시태양에서, 본 발명의 항체는 위치 4 및/또는 47에서 변형된 변이체 κ I 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 치환은 M4L 및/또는 L47F이다.

[0336] 본 발명의 항체는 항체가 목적하는 생물학적 특징 (예를 들어, 목적하는 결합 친화도)을 보인다면 임의의 적합한 인간 또는 인간 컨센서스 경쇄 프레임워크 서열을 포함할 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 κ 경쇄의 프레임워크 서열의 적어도 일부 (또는 전부)를 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 κ 하위군 I 프레임워크 컨센서스 서열의 적어도 일부 (또는 전부)를 포함한다.

[0337] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 9 (도 7a-b) 및/또는 13 (도 8a-b)에 제시된 프레임워크 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0338] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 세포독성체에 접합된 인간화 항-CD79b 항체이다. 한 측면에서, 세포독성체에 접합된 인간화 항-CD79b 항체는 이중이식편에서 종양 진행을 억제한다.

[0339] 한 측면에서, 인간화 항체 및 키메라 항체는 둘 모두 일가이다. 한 실시태양에서, 인간화 및 키메라 항체는 둘 모두 Fc 영역에 연결된 단일 Fab을 포함한다. 한 실시태양에서, 참조 키메라 항체는 인간 Fc 영역에 연결된 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된 가변 도메인 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 인간 Fc 영역은 IgG (예를 들어, IgG1, 2, 3 또는 4)의 해당 영역이다.

[0340] 한 측면에서, 본 발명은 도 15에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 164-166)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 15에 제시된 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (서열 160-163)를 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 15에 제시된 CH1 및/또는 Fc 서열 (서열 167 및/또는 168)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 15, 서열 164-166), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 15, 서열 160-163)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 15, 서열 164-166)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 도 15에 제시된 CH1 및/또는 Fc 서열 (서열 167 및/또는 168)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 15, 서열 164-166), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 15, 서열 160-163)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 CH1 및/또는 Fc (도 15, 서열 167 및/또는 168)을 포함한다.

[0341] 한 측면에서, 본 발명은 도 15에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 156-158)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 15에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 152-155)을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 15에 제시된 CL1 서열 (서열 159)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 156-158), 및 도 15에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 152-155)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 156-158)을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 15에 제시된 CL1 서열 (서열 159)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 156-158), 및 도 15에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC (서열 152-155) 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 15에 제시된 CL1 서열 (서열 159)을 포함한다.

[0342] 한 측면에서, 본 발명은 도 16에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 183-185)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 16에 제시된 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (서열 179-182)을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 16에 제시된 CH1 및/또는 Fc 서열 (서열 186 및/또는 187)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 16, 서열 183-185), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 16, 서열 179-182)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 16, 서열 183-185)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 도 16에 제시된 CH1 및/또는 Fc

서열 (서열 186 및/또는 187)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 16, 서열 183-185), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 16, 서열 179-182)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 CH1 및/또는 Fc (도 16, 서열 186 및/또는 187)를 포함한다.

[0343]

한 측면에서, 본 발명은 도 16에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 175-177)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 16에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 171-174)을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 16에 제시된 CL1 서열 (서열 178)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 175-177), 및 도 16에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 171-174)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 175-177)을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 16에 제시된 CL1 서열 (서열 178)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 175-177), 및 도 16에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC (서열 171-174) 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 16에 제시된 CL1 서열 (서열 178)을 포함한다.

[0344]

한 측면에서, 본 발명은 도 17에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 202-204)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 17에 제시된 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (서열 198-201)을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 17에 제시된 CH1 및/또는 Fc 서열 (서열 205 및/또는 206)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 17, 서열 202-204), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 17, 서열 198-201)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 17, 서열 202-204)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 도 17에 제시된 CH1 및/또는 Fc 서열 (서열 205 및/또는 206)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 17, 서열 202-204), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 17, 서열 198-201)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 CH1 및/또는 Fc (도 17, 서열 205 및/또는 206)를 포함한다.

[0345]

한 측면에서, 본 발명은 도 17에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 194-196)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 17에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 190-193)을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 17에 제시된 CL1 서열 (서열 197)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 194-196), 및 도 17에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 190-193)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 194-196)을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 17에 제시된 CL1 서열 (서열 197)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 194-196), 및 도 17에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC (서열 190-193)을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 17에 제시된 CL1 서열 (서열 197)을 포함한다.

[0346]

한 측면에서, 본 발명은 도 18에 제시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (서열 221-223)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 18에 제시된 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (서열 217-220)을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 18에 제시된 CH1 및/또는 Fc 서열 (서열 224 및/또는 225)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 18, 서열 221-223), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 18, 서열 217-220)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 18, 서열 221-223)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 도 18에 제시된 CH1 및/또는 Fc 서열 (서열 224 및/또는 225)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열 (도 18, 서열 221-223), 및 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및/또는 FR4-HC 서열 (도 18, 서열 217-220)을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 CH1 및/또는 Fc (도 18, 서열 224 및/또는 225)를 포함한다.

[0347]

한 측면에서, 본 발명은 도 18에 제시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 213-215)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 가변 도메인은 도 18에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 209-212)을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 도 18에 제시된 CL1 서열 (서열 216)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 213-215), 및 도 18에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열 (서열 209-212)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열

(서열 213-215)을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 18에 제시된 CL1 서열 (서열 216)을 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열 (서열 213-215), 및 도 18에 제시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC (서열 209-212) 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 및 도 18에 제시된 CL1 서열 (서열 216)을 포함한다.

[0348]

한 측면에서, 본 발명의 항체는 모 항체의 하나 이상의 아미노산이 W02006/034488; US 2007/0092940 (그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 개시된 유리 시스템인 아미노산으로 교체된 시스템인 조작된 항체를 포함한다. 임의의 형태의 항-CD79b 항체가 이와 같이 조작, 즉 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 모 Fab 항체 단편은 조작되어 시스템인 조작된 Fab (본원에서 "ThioFab"로서 칭함)를 형성할 수 있다. 유사하게, 모 모노클로날 항체는 조작되어 "ThioMab"을 형성할 수 있다. 단일 부위 돌연변이는 ThioFab에서 단일 조작된 시스템인 잔기를 생성시키는 반면, IgG 항체의 이량체 성질 때문에 단일 부위 돌연변이는 ThioMab에서 2개의 조작된 시스템인 잔기를 생성시킴을 알아야 한다. 본 발명의 시스템인 조작된 항-CD79b 항체는 세포-회합된 CD79b 폴리펩티드에 우선적으로 결합하는 모노클로날 항체, 인간화 또는 키메라 모노클로날 항체, 및 항체의 항원-결합 단편, 융합 폴리펩티드 및 유사체를 포함한다. 시스템인 조작된 항체는 별법으로 반드시 모 항체를 변경시키지는 않으면서 항체의 서열 설계 및/또는 선택에 의해, 예를 들어 파지 디스플레이 항체 설계 및 선택에 의해 또는 경쇄 및/또는 중쇄 프레임워크 서열 및 불변 영역의 드 노보 (de novo) 설계를 통해, 항체 또는 Fab 내의 본원에서 개시된 위치에 시스템을 포함하는 항체를 포함할 수 있다. 시스템인 조작된 항체는 티올 반응성 값이 0.6 내지 1.0; 0.7 내지 1.0 또는 0.8 내지 1.0인 하나 이상의 유리 시스템인 아미노산을 포함한다. 유리 시스템인 아미노산은 모 항체 내로 조작되고 디설피드 다리의 일부가 아닌 시스템인 잔기이다. 시스템인 조작된 항체는 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해 세포독성 및/또는 영상화 화합물을 조작된 시스템인의 부위에 부착시킬 때 유용하다. 말레이미드기에 대한 Cys 잔기의 티올 관능기의 친핵 반응성은 단백질 내의 임의의 다른 아미노산, 예를 들어 리신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비해 약 1000배 더 크다. 요오도아세틸 및 말레이미드 시약의 티올 특이적 관능기는 아민기와 반응할 수 있지만, 보다 높은 pH (>9.0) 및 보다 긴 반응 시간이 필요하다 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

[0349]

한 측면에서, 본 발명의 시스템인 조작된 항-CD79b 항체는 아래에 제시되는 임의의 하나의 위치에서 조작된 시스템을 포함하고, 여기서 위치는 경쇄의 경우에 카바트 등에 따라 넘버링되고 ([Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD] 참조), 중쇄 (Fc 영역 포함)의 경우에는 EU 넘버링에 따라 넘버링하고 ([Kabat et al. (1991), 상기 문헌] 참조), 도 24A, 25A, 26A, 27A, 28, 48A 및 49A에서 밑줄로 나타난 경쇄 불변 영역은 위치 109 (카바트 넘버링)에서 시작하고, 도 24B, 25B, 26B, 27B, 28B, 48B 및 49B에서 밑줄로 표시한 중쇄 불변 영역은 위치 118 (EU 넘버링)에서 시작한다. 또한, 위치는 도 24-28, 48 및 49에 제시된 전장 경쇄 또는 중쇄의 아미노산의 순차적인 넘버링에서 그의 위치로 언급될 수 있다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 항-CD79b 항체는 LC-V205C (카바트 넘버: Val 205; 그 위치에 Cys이 존재하도록 조작된 도 27A 및 49A에서의 순차적인 번호 209)에서 조작된 시스템을 포함한다. 경쇄에서 조작된 시스템인은 도 27A 및 49A에서 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 한 실시태양에 따르면, 항-CD79b 항체는 HC-A118C (EU 넘버: A1a 118; 카바트 넘버 114; 그 위치에 Cys이 존재하도록 조작된 도 24B, 25B, 26B, 28B 또는 48B에서의 순차적인 넘버 118)에서 조작된 시스템을 포함한다. 중쇄 내의 조작된 시스템인은 도 24B, 25B, 26B, 28B 또는 48B에서 굵은 글씨체로 이중 밑줄로 나타낸다. 한 실시태양에 따르면, 항-CD79b 항체는 Fc-S400C (EU 넘버: Ser 400; 카바트 넘버 396; 그 위치에 Cys이 존재하도록 조작된 도 24B, 25B, 26B, 28B 또는 48B에서의 순차적인 넘버 400)에서 조작된 시스템을 포함한다. 다른 실시태양에서, 중쇄 (Fc 영역 포함)의 조작된 시스템인은 다음 위치 (카바트 넘버링에 따른 위치 (EU 넘버링은 괄호로 표시))의 임의의 하나에 존재한다: 5, 23, 84, 112, 114 (118 EU 넘버링), 116 (120 EU 넘버링), 278 (282 EU 넘버링), 371 (375 EU 넘버링) 또는 396 (400 EU 넘버링). 따라서, 본 발명의 모 인간화 항-CD79b 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 V5C, A23C, A84C, S112C, A114C (A118C EU 넘버링), T116C (T120C EU 넘버링), V278C (V282C EU 넘버링), S371C (S375C EU 넘버링) 또는 S396C (S400C EU 넘버링)이다. 따라서, 본 발명의 모 키메라 항-CD79b 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (A118C EU 넘버링), T116C (T120C EU 넘버링), V278C (V282C EU 넘버링), S371C (S375C EU 넘버링) 또는 S396C (S400C EU 넘버링)이다. 따라서, 본 발명의 모 항-cynoCD79b 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 Q5C, T23C, S84C, S112C, A114C (A118C EU 넘버링), T116C (T120C EU 넘버링), V278C (V282C EU 넘버링), S371C (S375C EU 넘버링) 또는 S396C (S400C EU 넘버링)이다. 다른 실시태양에서, 경쇄의 조작된 시스템인은 다음 위치 (카바트 넘버링에 따른) 중 임의의 하나에 위치한다: 15, 110, 114, 121, 127, 168, 205. 따라서, 본 발명의 모 인간화 항-CD79b 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 V15C,

V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, 또는 V205C이다. 따라서, 본 발명의 모 키메라 항-CD79b 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, 또는 V205C이다. 따라서, 본 발명의 모 항-cynoCD79b 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, 또는 V205C이다.

- [0350] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함하는 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 포함하고, 여기서 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 CD79b 폴리펩티드에 결합하고, 모 항-CD79b 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 교체하는 것을 포함하는 공정에 의해 제조되고, 여기서 모 항체는
- [0351] (a) 서열 A1-A15를 포함하는 HVR-L1 (여기서, A1-A15는 KASQSVVDYDGSFLN (서열 131) 또는 KASQSVDYEGDSFLN (서열 137)임);
- [0352] (b) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 (여기서, B1-B7은 AASNLES (서열 132)임);
- [0353] (c) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 (여기서, C1-C9는 QQSNEPLT (서열 133)임);
- [0354] (d) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 (여기서, D1-D10은 GYTFSSYWIE (서열 134)임);
- [0355] (e) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 (여기서, E1-E18은 GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 135)임); 및
- [0356] (f) 서열 F1-F10을 포함하는 HVR-H3 (여기서, F1-F10은 TRRPVYFDY (서열 136) 및 TRRPVIRLDY (서열 138)임)
- [0357] 중에서 선택되는 적어도 하나의 HVR 서열을 포함한다.
- [0358] 특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 전장 아미노산 서열을 갖는 시스테인 조작된 항체 또는 본원에 개시된 신호 펩티드가 결합된 시스테인 조작된 항체 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 시스테인 조작된 항-CD79b 항체에 관한 것이다.
- [0359] 추가의 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 개시된 전장 아미노산 서열을 갖는 시스테인 조작된 항체, (b) 본원에 개시된 신호 펩티드가 결합된 시스테인 조작된 항체 아미노산 서열, (c) 본원에 개시된, 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 막횡단 시스테인 조작된 항체 단백질의 세포외 도메인, (d) 본원에 개시된 임의의 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 (e) 본원에 개시된 전장 시스테인 조작된 항체 아미노산 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편을 코딩하는 DNA 분자의 보체에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 시스테인 조작된 항-CD79b 항체에 관한 것이다.
- [0360] 특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는, N-말단 신호 서열이 존재하지 않고/않거나 개시 메티오닌이 존재하지 않는 단리된 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 제공한다. 상기 항체를 제조하는 방법을 또한 본원에 기재하고, 여기서 상기 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 시스테인 조작된 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하고, 세포 배양액으로부터 시스테인 조작된 항체를 회수하는 것을 포함한다.
- [0361] 본 발명의 다른 측면은 막횡단 도메인이 결실되거나 또는 막횡단 도메인이 불활성화된 단리된 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 제공한다. 상기 항체를 제조하기 위한 방법도 본원에 기재하고, 여기서 상기 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 시스테인 조작된 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하고, 세포 배양액으로부터 시스테인 조작된 항체를 회수하는 것을 포함한다.
- [0362] 다른 측면에서, 본 발명은 이중 (비-CD79b) 폴리펩티드에 융합된, 본원에 기재된 임의의 시스테인 조작된 항체를 포함하는 단리된 항-CD79b 키메라 시스테인 조작된 항체를 제공한다. 상기 키메라 분자의 예는 이중 폴리펩티드, 예를 들어, 면역글로불린의 에피토프 태그 서열 또는 Fc 영역에 융합된, 본원에 기재된 임의의 시스테인 조작된 항체를 포함한다.
- [0363] 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 그의 각각의 항원 에피토프에 대한 항-CD79b 폴리펩티드 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일쇄 항체 또는 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 독소, 예를 들어, 아우리스타틴, 메이탄시노이드, 돌로스타틴 유도체 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 핵산분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의로 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있고, 바람직하게는 항체가 결합하는 세포의 성장 또는 증식을 억제하거나 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 진단 목적을 위해, 본 발명의 항체는 검출

가능하게 표지되거나 고체 지지체 등에 부착될 수 있다.

[0364] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-CD79b 항체 및 항-CD79b 시스템인 조작된 항체를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 임의의 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포도 제공된다. 예로서, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이 세포, 또는 효모 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법을 추가로 제공하고, 이는 숙주 세포를 목적하는 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 배양하고, 세포 배양액으로부터 목적하는 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함한다.

[0365] 시스템인 조작된 항체는 암 치료에 유용할 수 있고, 세포 표면 및 막횡단 수용체, 및 종양 관련 항원 (TAA)에 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 네이키드 항체 (약물 또는 표지 모이어티에 접합되지 않은)로서 또는 항체-약물 접합체 (ADC)로서 사용될 수 있다. 본 발명의 시스템인 조작된 항체는 티올-반응성 시약과 부위-특이적으로 및 효율적으로 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다관능성 링커 시약, 포획 표지 시약, 형광단 시약, 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 시스템인 조작된 항체는 검출가능한 표지로 표지되고, 고상 지지체에 고정되고/되거나 약물 모이어티와 접합될 수 있다. 티올 반응성은 반응성 시스템인 아미노산으로의 아미노산 치환이 L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210의 아미노산 범위로부터 선택된 경쇄의 범위 내에서; H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121의 아미노산 범위로부터 선택된 중쇄의 범위 내에서; 및 H270-H280, H366-H376, H391-401에서 선택된 범위 내의 Fc 영역에서 이루어질 수 있는 임의의 항체로 일반화될 수 있고, 여기서 아미노산 위치의 넘버링은 카바트 넘버링 시스템 (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)의 위치 1에서 시작되고, 이후에 W02006034488; US 2007/0092940에 개시된 바와 같이 순차적으로 계속된다. 또한, 티올 반응성은 항체의 특정 도메인, 예를 들어 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 일반화될 수도 있다. 0.6 이상의 티올 반응성 값을 유도하는 시스템인 교체는 무손상 항체 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM (IgG 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2 포함) 각각의 중쇄 불변 도메인 α , δ , ϵ , γ 및 μ 에서 만들어질 수 있다. 상기 항체 및 그의 용도는 W02006/034488; US 2007/0092940에 개시되어 있다.

[0366] 본 발명의 시스템인 조작된 항체는 바람직하게는 그의 야생형 모 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유한다. 따라서, 시스템인 조작된 항체는 바람직하게는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 항원은 예를 들어 종양 관련 항원 (TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 다른 세포 표면 분자, 막횡단 단백질, 신호전달 단백질, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발달 또는 분화와 연관된 분자 (예를 들어, 조직 발달 또는 분화에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 의심되는), 림포킨, 시토킨, 세포 주기 조절에 관여하는 분자, 혈관 형성에 관여하는 분자 및 혈관신생에 관여하는 분자 (예를 들어, 혈관신생에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 의심되는)를 포함한다. 종양 관련 항원은 클러스터 (cluster) 분화 인자 (즉, CD79b를 포함하고 이로 제한되지 않는 CD 단백질)일 수 있다. 본 발명의 시스템인 조작된 항-CD79b 항체는 그의 모 항-CD79b 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유한다. 따라서, 바람직하게는 본 발명의 시스템인 조작된 항-CD79b 항체는 B 세포를 포함하고 이로 제한되지 않는 세포의 표면 상에 CD79b 항원이 발현될 때를 포함하여 CD79b 항원, 예를 들어 인간 항-CD79b 이소형 베타 및/또는 알파에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0367] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 반응성 모이어티, 활성화된 모이어티, 또는 반응성 시스템인 티올기를 통해 항체에 공유결합에 의해 부착될 수 있는 임의의 표지 모이어티에 접합될 수 있다 ([Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-15]; [Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; [Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL]). 부착된 표지는 리간드 친화도, 항체/항원 결합, 또는 이온 복합체 형성을 조정하기 위해 (i) 검출가능한 신호를 제공하거나, (ii) 제2 표지와 상호작용하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공되는 검출가능한 신호를 변형시켜, 예를 들어 FRET (형광 공명 에너지 전달)를 생성시키거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호작용을 안정화하거나 이들과의 결합친화도를 증가시키거나, (iv) 이동성, 예를 들어 전기영동 이동성, 또는 세포-투과도에 대해 전하, 소수성, 형태 또는 다른 물리적 파라미터로 인한 영향을 주거나, 또는 (v) 포획 모이어티를 제공하는 기능을 할 수 있다.

[0368] 표지된 시스템인 조작된 항체는 예를 들어 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 목적하는 항원의 발현을 검출하기 위한 진단 분석에서 유용할 수 있다. 진단 용도를 위해, 항체는 대개 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 일반적으로 하기 범주로 분류될 수 있는 수많은 표지를 이용할 수 있다:

[0369] 방사선 동위원소 (방사선 핵종), 예를 들어 ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I ,

¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³³Xe, ¹⁷⁷Lu, ²¹¹At 또는 ²¹³Bi. 방사선 동위원소 표지된 항체는 수용체 표적화된 영상화 실험에 유용하다. 항체는 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 방사선 동위원소 금속에 결합하거나 킬레이팅되거나 또는 다른 방식으로 복합체를 형성하며 항체의 조작된 시스템인 티올과 반응성인 리간드 시약으로 표지될 수 있다. 금속 이온과 착물을 형성할 수 있는 킬레이팅 리간드로는 DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA 및 TETA (마크로시클릭스 (Macrocyclics), 미국 텍사스주 델러스) 등이 있다. 방사선 핵종은 본 발명의 항체-약물 접합체와의 복합체 형성을 통해 표적화될 수 있다 [Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146].

[0370]

링커 시약, 예를 들어 DOTA-말레이미드 (4-말레이미도부티르아미도벤질-DOTA)는 문헌 [Axworthy et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807]의 절차에 따라 아미노벤질-DOTA를 이소프로필클로로포르메이트 (알드리치 (Aldrich))로 활성화시킨 4-말레이미도부티르산 (플루카 (Fluka))과 반응시켜 제조할 수 있다. DOTA-말레이미드 시약은 시스템인 조작된 항체의 유리 시스템인 아미노산과 반응하여 항체 상에 금속 착물 형성 리간드를 제공한다 [Lewis et al. (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86]. 킬레이팅 링커 표지 시약, 예를 들어 DOTA-NHS (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노(N-히드록시숙신이미드 에스테르)는 시판되고 있다 (마크로시클릭스, 미국 텍사스주 델러스). 방사선 핵종 표지된 항체를 사용한 수용체 표적 영상화는 중앙 조직 중 항체의 점진적인 축적을 검출 및 정량함으로써 경로 활성화의 마커를 제공할 수 있다 [Albert et al. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210]. 접합된 방사성 금속은 라이소좀 분해 후 세포 내에 남아있을 수 있다.

[0371]

영상화 실험을 위한 항체 표지로서 적합한 금속-킬레이트 복합체가 다음 문헌에 개시되어 있다: 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].

[0372]

형광 표지, 예를 들어 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), FITC, 5-카르복시플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인 등을 비롯한 플루오레세인 유형, TAMRA 등을 비롯한 로다민 유형; 단실; 리사민 (Lissamine); 시아닌; 피코에리트린; 텍사스 레드 (Texas Red) 및 이들의 유사체. 형광 표지는 예를 들어 문헌 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌]에 개시된 기술을 이용하여 항체에 접합될 수 있다. 형광 염료 및 형광 표지 시약은 인비트로젠 (Invitrogen)/몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 미국 오레곤주 유진) 및 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록포트)에서 시판하는 것을 포함한다.

[0373]

다양한 효소-기질 표지가 이용가능하거나 문헌에 개시되어 있다 (US 4275149). 효소는 일반적으로 다양한 기술을 이용하여 측정할 수 있는 발색 기질의 화학적 변경을 촉매한다. 예를 들어, 효소는 기질에서 색상 변화를 촉매할 수 있고, 이것은 분광학적으로 측정할 수 있다. 별법으로, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광 변화를 정량하는 기술은 상기한 바와 같다. 화학발광 기질은 화학 반응에 의해 전자적으로 여기되고, 이후에는 (예를 들어 화학발광 측정기를 사용하여) 측정될 수 있는 광을 방출하거나 형광 수용자에게 에너지를 제공할 수 있다. 효소 표지의 예로는 루시페라제 (예, 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제, US 4737456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 데히드로게나제, 우레아제, 퍼옥시다제, 예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP), β-갈락토시다제, 글루코아미라제, 리소자임, 당류 옥시다제 (예, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예를 들어 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등이 있다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 문헌 [O'Sullivan et al. (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van

Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166]에 기재되어 있다.

- [0374] 효소-기질 조합의 예는 예를 들어 다음을 포함한다:
- [0375] (i) 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 기질로서의 수소 퍼옥시다제 - (여기서, 수소 퍼옥시다제는 염료 전구체 (예, 오르토펜렌 디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 염산염 (TMB))를 산화시킴),
- [0376] (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP)와 발색 기질로서의 파라-니트로페닐 포스페이트, 및
- [0377] (iii) β -D-갈락토시다제 (β -D-Gal)와 발색 기질 (예, p-니트로페닐- β -D-갈락토시다제) 또는 형광 기질 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토시다제.
- [0378] 당업자는 많은 다른 효소-기질 조합을 이용할 수 있다. 일반적인 검토를 위해서 US 4275149 및 US 4318980을 참조한다.
- [0379] 표지는 아미노산 측쇄, 활성화된 아미노산 측쇄, 시스템인 조작된 항체 등에 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체를 비오틴과 접합시키고, 상기 언급한 표지의 3가지 광범위한 범주 중 임의의 표지가 아비딘 또는 스트렙타비딘에 접합될 수도 있고, 또는 그 반대로 접합될 수도 있다. 비오틴은 스트렙타비딘에 선택적으로 결합하기 때문에, 표지는 이와 같은 간접적인 방식으로 항체에 접합될 수 있다. 별법으로, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시키기 위해서, 폴리펩티드 변이체는 작은 합텐 (예, 디곡신)과 접합시키고 상기 언급한 여러 유형의 표지 중 하나를 항-합텐 폴리펩티드 변이체 (예, 항-디곡신 항체)와 접합시킨다. 따라서, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시킬 수 있다 [Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego].
- [0380] 본 발명의 항체는 임의의 공지된 분석 방법, 예를 들어 ELISA, 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석 및 면역침전 분석 등에 사용될 수 있다 [Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.].
- [0381] 검출 표지는 결합 또는 인식 사건을 국소화하고 가시화하며 정량하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 표지된 항체는 세포-표면 수용체를 검출할 수 있다. 검출가능하게 표지된 항체의 또다른 용도는 비드를 형광 표지된 항체와 접합시키고, 리간드의 결합시에 형광 신호를 검출하는 것을 포함하는 비드-기반 면역포획 (immunocapture) 방법이다. 유사한 결합 검출 방법은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 효과를 이용하여 항체-항원 상호작용을 측정하고 검출한다.
- [0382] 검출 표지, 예를 들어 형광 염료 및 화학발광 염료 [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]는 검출가능한 신호를 제공하고, 일반적으로 다음 특성을 갖는 항체 표지에 적용가능한 것이 바람직하다: (i) 표지된 항체는 낮은 배경으로 매우 높은 신호를 생성하여 소량의 항체가 무-세포 분석 및 세포-기반 분석 둘 모두에서 민감하게 검출될 수 있도록 해야 하고, (ii) 표지된 항체는 광안정성이어서 형광 신호가 유의한 광표백 (photo bleaching) 없이 관찰되고 모니터링되며 기록될 수 있어야 한다. 표지된 항체를 특히 살아있는 세포의 막 또는 세포 표면에 결합시키는 것을 포함하는 용도를 위해서는, 상기 표지가 (iii) 효과적인 접합체 농도 및 검출 감수성 달성을 위해 양호한 수용성을 보유하고, (iv) 세포의 정상적인 대사 과정을 파괴하거나 조기 세포 사멸을 초래하지 않도록 살아있는 세포에 무독성인 것이 바람직하다.
- [0383] 세포 형광 강도의 직접 정량화 및 형광 표지 사건의 확인, 예를 들어 펩티드-염료 접합체의 세포 표면 결합은 살아있는 세포 또는 비드와의 혼합/해독 (mix-and-read), 비-방사성 분석을 자동화한 시스템 (FMAT(등록상표) 8100 HTS 시스템, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아 포스터 시티))에서 수행될 수 있다 [Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204]. 표지된 항체의 용도에는, 세포 표면 수용체 결합 분석, 면역포획 분석, 형광 연결된 면역흡착 분석 (FLISA), 카스파제-절단 ([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), 세포자멸 [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] 및 세포독성 분석도 포함된다. 형광 마이크로부피 분석 기술은, 세포 표면에 표적화된 분자에 의한 상향 또는 하향 조절을 확인하는데 이용될 수 있다 [Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput

screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51].

[0384] 본 발명의 표지된 항체는 생체외학적 영상화와 분자 영상화의 다양한 방법 및 기술, 예를 들어 (i) MRI (자기 공명 영상화), (ii) MicroCT (컴퓨터 단층촬영), (iii) SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영), (iv) PET (양전자 방출 단층촬영) [Chen et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49], (v) 생체발광, (vi) 형광, 및 (vii) 초음파에 의한 영상화 생물마커 및 프로브로서 유용하다. 면역섬광조영술 (immunoscintigraphy)은 방사성 물질로 표지된 항체를 동물 또는 인간 환자에게 투여하고 항체가 위치하는 신체 부위의 사진을 찍는 영상화 절차이다 (US 6528624). 영상화 생물마커는 객관적으로 측정되어 정상적인 생물학적 과정, 발병 과정 또는 치료 개입에 대한 약물 반응의 지시자로서 평가될 수 있다. 생물 마커는 여러가지 유형일 수 있다: 제0형은 질환의 천연 병력 마커이며, 공지된 임상 지표, 예를 들어 류마티스성 관절염에서 활액 염증의 MRI 평가와 장기적으로 상관관계가 있고; 제I형 마커는 작용 메커니즘이 임상 결과와 관련되지 않을 수 있는 경우에도 이 메커니즘에 따른 개입 효과를 보여주며; 제II형 마커는 대리 종말점으로서 기능하여, 생물마커의 변화 또는 생물마커로부터의 신호가 표적화된 반응의 "유효성", 예를 들어 류마티스성 관절염에서 CT에 의한 골 침식 측정치에 대한 임상적 잇점을 예측한다. 따라서, 영상화 생물마커는 (i) 표적 단백질의 발현, (ii) 표적 단백질에 대한 치료제의 결합, 즉 선택성, 및 (iii) 소실을 및 반감기 약력학 데이터에 대한 약동학 (PD) 치료 정보를 제공할 수 있다. 시험관에서 사용되는 생물마커에 비해 생체내 영상화 생물마커의 잇점은 비-침습적 치료, 정량화가능한 전신 평가, 반복적 투여 및 평가, 즉 여러 시점에서의 투여 및 평가, 및 전임상 결과 (작은 동물)로부터 임상 (인간) 결과로의 잠재적으로 전이가 가능한 효과를 포함한다. 몇몇 용도의 경우, 생체영상화는 전임상 연구에서의 동물 실험을 대체하거나 그 횟수를 최소화한다.

[0385] 펩티드 표지 방법은 공지되어 있다. 문헌 ([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 and New York] 및 [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])을 참조한다.

[0386] 충분히 근접한 두 모이어티, 즉 형광 리포터 및 켄처 (quencher)로 표지된 펩티드 및 단백질에서는 형광 공명 에너지 전달 (FRET)이 일어난다. 리포터기는 대체로 특정 파장의 광에 의해 여기되고 최대 밝기에서 방출될 수 있는 적절한 스톱스 이동 (Stokes shift)으로 에너지를 수용기 또는 켄처기에 전달하는 형광 염료이다. 형광 염료에는 연장된 방향성 (extended aromaticity)을 갖는 분자, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 이들의 유도체 등이 있다. 형광 리포터는 무손상 펩티드 중의 켄처 모이어티에 의해 부분적으로 또는 유의하게 켄칭될 수 있다. 펩티다제 또는 프로테아제에 의한 펩티드의 절단시에, 검출가능한 형광 증가가 측정될 수 있다 [Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34].

[0387] 본 발명의 표지된 항체는 친화도 정제제로서 사용될 수도 있다. 이 과정에서, 표지된 항체는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 세파덱스 (Sephadex) 수지 또는 여과지와 같은 고체상에 고정된다. 고정된 항체를 정제될 항원을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 지지체를 정제될 항원을 제외하고는 샘플 중에 존재하는 실질적으로 모든 물질을 제거할 적합한 용매로 세척하고, 여기서 상기 항원은 고정된 폴리펩티드 변이체에 결합한다. 최종적으로, 상기 지지체를 폴리펩티드 변이체로부터 항원을 방출시킬 또다른 적합한 용매, 예를 들어 글리신 버퍼 (pH 5.0)로 세척한다.

[0388] 표지 시약은 전형적으로 (i) 시스테인 조작된 항체의 시스테인 티올과 직접 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있거나, (ii) 링커 시약과 반응하여 링커-표지 중간체를 형성할 수 있거나, 또는 (iii) 링커 항체와 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있는 반응성 관능기를 보유한다. 표지 시약의 반응성 관능기로는, 말레이미드, 할로아세틸, 요오도아세틸아미드 숙신이미드 에스테르 (예, NHS, N-히드록시숙신이미드), 이소티오시아네이트, 술폰일 클로라이드, 2,6-디클로로트리아지닐, 펜타플루오로페닐 에스테르 및 포스포아미다이트 등이 있으나, 다른

관능기도 사용될 수 있다.

[0389] 예시적인 반응성 관능기는 검출가능한 표지, 예를 들어 비오틴 또는 형광 염료의 카르복실기 치환체 중의 N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS)이다. 표지의 NHS 에스테르는 예비 형성, 단리, 정제 및/또는 특성화될 수 있거나, 또는 계내 형성되어 항체의 친핵기와 반응할 수 있다. 전형적으로, 표지의 카르복실 형태는 카르보디이미드 시약, 예를 들어 디시클로헥실카르보디이미드, 디이소프로필카르보디이미드, 또는 유로늄 시약, 예를 들어 TSTU (O-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 테트라플루오로보레이트, HBTU (O-벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트) 또는 HATU (O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트), 활성화, 예를 들어 1-히드록시 벤조트리아졸 (HOBt) 및 N-히드록시숙신이미드의 몇가지 조합과의 반응으로 활성화되어 표지의 NHS 에스테르를 형성한다. 몇몇 경우에는, 표지 및 항체가 표지의 계내 활성화 및 항체와의 반응으로 커플링되어 표지-항체 접합체를 1단계로 형성할 수 있다. 다른 활성화 및 커플링 시약으로는, TBTU (2-(1H-벤조트리아조-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트), TFFH (N,N',N'',N'''-테트라메틸유로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트), PyBOP (벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트, EEDQ (2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로-퀴놀린), DCC (디시클로헥실카르보디이미드), DIPCDI (디이소프로필카르보디이미드), MSNT (1-(메시틸렌-2-술포닐)-3-니트로-1H-1,2,4-트리아졸 및 아릴 술포닐 할라이드, 예를 들어 트리이소프로필벤젠 술포닐 클로라이드 등이 있다.

[0390] 본 발명의 알부민 결합 펩티드-Fab 화합물:

[0391] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 알부민 결합 단백질에 융합된다. 혈장-단백질 결합은 수명이 짧은 분자의 약력학 특성을 개선시키는데 효과적인 수단일 수 있다. 알부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질이다. 혈청 알부민 결합 펩티드 (ABP)는 조직 흡수, 투과 및 확산의 변경 등을 비롯하여 융합된 활성 도메인 단백질의 약동학을 변경시킬 수 있다. 이들 약동학 파라미터는 적절한 혈청 알부민 결합 펩티드 서열의 특이적 선택을 통해 조정될 수 있다 (US 20040001827). 일련의 알부민 결합 펩티드가 파지 디스플레이 스크리닝을 통해 확인되었다 ([Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043], WO 01/45746). 본 발명의 화합물은 (i) 문헌 [Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043]의 표 III 및 표 IV, 35038 페이지, (ii) US 20040001827의 [0076] 서열 9 내지 22, 및 (iii) WO 01/45746의 12 내지 13 페이지에 제시되어 있는 ABP 서열을 포함하며, 상기 문헌 모두가 본원에 참조로 포함된다. 알부민 결합 펩티드를 Fab 중쇄의 C-말단에 1:1의 화학양론적 비율 (1 ABP/1 Fab)로 융합시켜 알부민 결합 (ABP)-Fab를 조작한다. 이들 ABP-Fab와 알부민의 회합은 토끼 및 마우스에서 항체 반감기를 25배 초과로 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 설명한 반응성 Cys 잔기는 이들 ABP-Fab에 도입되어 세포독성 약물과의 부위-특이적 결합 및 이후의 생체내 동물 연구에 사용될 수 있다.

[0392] 예시적인 알부민 결합 펩티드 서열은 서열 246-250에 제시된 아미노산 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0393] CDKTHTGGSQRLMEDICLPWGCLWEDDF 서열 246

[0394] QRLMEDICLPWGCLWEDDF 서열 247

[0395] QRLIEDICLPWGCLWEDDF 서열 248

[0396] RLIEDICLPWGCLWEDD 서열 249

[0397] DICLPWGCLW 서열 250

[0398] 항체-약물 접합체

[0399] 다른 측면에서, 본 발명은 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체, 또는 항체-약물 접합체 (ADC)를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 추가로 면역접합체를 사용하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 면역접합체는 세포독성제 또는 검출가능한 물질에 공유결합에 의해 부착된 임의의 상기 항-CD79b 항체를 포함한다.

[0400] 한 측면에서, 본 발명의 CD79b 항체는 다른 CD79b 항체가 결합하는 CD79b 상의 동일한 에피토프에 결합한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 CD79b 항체는 1993년 7월 20일자로 ATCC에 HB11413으로 기탁된 하이브리도마로부터 생성된 모노클로날 항체, 서열 10 (도 7a-b) 및 서열 14 (도 8a-b)의 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 1993년 7월 20일에 ATCC에 기탁된 HB11413 하이브리도마로부터 생성된 항체의 가변 도메인 및 IgG1의

불변 도메인, 또는 서열 10 (도 7a-b) 및 서열 14 (도 8a-b)의 서열을 포함하는 모노클로날 항체의 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체의 Fab 단편이 결합하는 CD79b 상의 동일한 에피토프에 결합한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 CD79b 항체는 다른 CD79b 항체 (즉, CB3.1 (비디 바이오사이언시스 (BD Biosciences) 카탈로그 #555678; 미국 캘리포니아주 산 호세), AT105-1 (에이비디 세로텍 (AbD Serotec) 카탈로그 #MCA2208; 미국 노스캐롤라이나주 롤리), AT107-2 (에이비디 세로텍 카탈로그 #MCA2209), 항-인간 CD79b 항체 (비디 바이오사이언시스 카탈로그 #557592; 미국 캘리포니아주 산 호세))가 결합하는 CD79b 상의 동일한 에피토프에 결합한다.

[0401]

한 측면에서, 본 발명의 CD79b 항체는 다른 CD79b 항체가 결합하는 에피토프와 구분되는 CD79b 상의 에피토프에 결합한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 CD79b 항체는 1993년 7월 20일자로 ATCC에 HB11413으로 기탁된 하이브리도마로부터 생성된 모노클로날 항체, 서열 10 (도 7a-b) 및 서열 14 (도 8a-b)의 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 1993년 7월 20일에 ATCC에 기탁된 HB11413 하이브리도마로부터 생성된 항체의 가변 도메인 및 IgG1의 불변 도메인, 또는 서열 10 (도 7a-b) 및 서열 14 (도 8a-b)의 서열을 포함하는 모노클로날 항체의 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체의 Fab 단편이 결합하는 에피토프와 구분되는 CD79b 상의 에피토프에 결합한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 CD79b 항체는 다른 CD79b 항체 (즉, CB3.1 (비디 바이오사이언시스 카탈로그 #555678; 미국 캘리포니아주 산 호세), AT105-1 (에이비디 세로텍 카탈로그 #MCA2208; 미국 노스캐롤라이나주 롤리), AT107-2 (에이비디 세로텍 카탈로그 #MCA2209), 항-인간 CD79b 항체 (비디 바이오사이언시스 카탈로그 #557592; 미국 캘리포니아주 산 호세))가 결합하는 CD79b 상의 에피토프와 구분되는 CD79b 상의 에피토프에 결합한다.

[0402]

다른 측면에서, 본 발명의 CD79b 항체는 1993년 7월 20일자로 ATCC에 HB11413으로 기탁된 하이브리도마로부터 생성된 모노클로날 항체, 서열 10 (도 7a-b) 및 서열 14 (도 8a-b)의 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 1993년 7월 20일에 ATCC에 기탁된 HB11413 하이브리도마로부터 생성된 항체의 가변 도메인 및 IgG1의 불변 도메인, 또는 서열 10 (도 7a-b) 및 서열 14 (도 8a-b)의 서열을 포함하는 모노클로날 항체의 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체의 Fab 단편과 구분된다 (즉, Fab 단편이 아니다). 다른 실시태양에서, 본 발명의 CD79b 항체는 다른 CD79b 항체 (즉, CB3.1 (비디 바이오사이언시스 카탈로그 #555678; 미국 캘리포니아주 산 호세), AT105-1 (에이비디 세로텍 카탈로그 #MCA2208; 미국 노스캐롤라이나주 롤리), AT107-2 (에이비디 세로텍 카탈로그 #MCA2209), 항-인간 CD79b 항체 (비디 바이오사이언시스 카탈로그 #557592; 미국 캘리포니아주 산 호세))의 Fab 단편과 구분된다 (즉, Fab 단편이 아니다).

[0403]

한 측면에서, 본 발명의 항체는 제1 동물 종의 CD79b에 특이적으로 결합하고, 제2 동물 종의 CD79b에는 특이적으로 결합하지 않는다. 한 실시태양에서, 제1 동물 종은 인간 및/또는 영장류 (예를 들어, 사이노몰거스 원숭이)이고, 제2 동물 종은 뮌 (예를 들어, 마우스) 및/또는 개이다. 한 실시태양에서, 제1 동물 종은 인간이다. 한 실시태양에서, 제1 동물 종은 영장류, 예를 들어 사이노몰거스 원숭이이다. 한 실시태양에서, 제2 동물 종은 뮌, 예를 들어 마우스이다. 한 실시태양에서, 제2 동물 종은 개이다.

[0404]

한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 항체 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시태양에서, 담체는 제약상 허용되는 것이다.

[0405]

한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 CD79b 항체를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0406]

한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0407]

한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 벡터는 임의의 종류, 예를 들어 재조합 벡터, 예를 들어 발현 벡터일 수 있다. 임의의 다양한 숙주 세포가 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 이. 콜라이이다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 세포, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.

[0408]

한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 CD79b 항체 (본원에 정의된 바와 같이 전장 및 그의 단편을 포함한다)를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 적합한 숙주 세포 내에서 상기 항체 (또는 그의 단편)를 코딩하는 본 발명의 재조합 벡터를 발현시키고, 상기 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0409]

한 측면에서, 본 발명은 용기; 및 용기 내에 담긴 조성물을 포함하는 제품을 제공하고, 여기서 조성물은 본 발명의 하나 이상의 CD79b 항체를 포함한다. 한 실시태양에서, 조성물은 본 발명의 핵산을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체를 포함하는 조성물은 일부 실시태양에서 제약상 허용되는 것인 담체를 추가로 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 제품은 대상체에게 조성물 (예를 들어, 항체)를 투여하기 위한 사용지시물을 추가로 포함

한다.

- [0410] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 CD79b 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 제1 용기; 및 버퍼를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 한 실시태양에서, 버퍼는 제약상 허용되는 것이다. 한 실시태양에서, 길항제 항체를 포함하는 조성물은 일부 실시태양에서 제약상 허용되는 것인 담체를 추가로 포함한다. 한 실시태양에서, 키트는 대상체에게 조성물 (예를 들어, 항체)을 투여하기 위한 사용지시물을 추가로 포함한다.
- [0411] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 CD79b 항체의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다.
- [0412] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 핵산의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다.
- [0413] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 발현 벡터의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다.
- [0414] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다.
- [0415] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 제품의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다.
- [0416] 한 측면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 목적의 및/또는 예방 목적의 처치를 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 키트의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 암, 종양 및/또는 세포 증식성 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다.
- [0417] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 세포를 본 발명의 항체와 접촉시켜, 상기 세포의 성장의 억제를 유발하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성제에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0418] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물을 치료 목적으로 처리하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 포유동물에게 치료 유효량의 본 발명의 항체를 투여하여, 상기 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성제에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0419] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b의 증가된 발현과 연관된 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 그 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하여, 상기 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 증식성 장애는 암이다. 한 실시

태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.

- [0420] 한 측면에서, 본 발명은 그 성장이 CD79b의 성장 강화 효과에 적어도 부분적으로 의존적인 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜, 상기 세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0421] 한 측면에서, 본 발명은 포유동물에서 그 성장이 CD79b의 성장 강화 효과에 적어도 부분적으로 의존적인 종양을 치료 목적으로 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜, 상기 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0422] 한 측면에서, 본 발명은 환자에게 본원에 기재된 면역접합체, 허용되는 회식제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 제제를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, 암은 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다. 한 실시태양에서, 환자에게 세포독성제를 항체-약물 접합체 화합물과 조합하여 투여한다.
- [0423] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b에 대한 면역접합체의 결합을 허용하는 조건 하에 본 발명의 항체를 포함하는 면역접합체에 세포를 노출시키는 것을 포함하는, B 세포 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, B 세포 증식은 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택된다. 한 실시태양에서, B 세포는 이중 이식편이다. 한 실시태양에서, 노출은 시험관 내에서 실시된다. 한 실시태양에서, 노출은 생체 내에서 발생한다.
- [0424] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b를 함유하는 것으로 의심되는 샘플 내에서 CD79b의 존재를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 샘플을 본 발명의 항체에 노출시키고, 상기 샘플 내의 CD79b에 대한 상기 항체의 결합을 결정하는 것을 포함하고, 여기서 상기 샘플 내의 CD79b에 대한 상기 항체의 결합은 상기 샘플 내에 상기 단 백질이 존재함을 나타낸다. 한 실시태양에서, 샘플은 생물학적 샘플이다. 추가의 실시태양에서, 생물학적 샘플은 B 세포를 포함한다. 한 실시태양에서, 생물학적 샘플은 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포 림프종을 포함하고 이로 제한되지 않는 B 세포 질환 및/또는 B 세포 증식성 장애를 겪고 있거나 겪고 있는 것으로 의심되는 포유동물로부터 채취한 샘플이다.
- [0425] 한 측면에서, CD79b를 발현하는 세포, 예를 들어 B 세포의 증가와 연관된 세포 증식성 장애를 진단하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 생물학적 샘플 내의 시험 세포를 임의의 상기 항체와 접촉시키고; CD79b에 대한 항체의 결합을 검출함으로써 샘플 내의 시험 세포에 결합된 항체의 수준을 결정하고; 대조 샘플 내의 세포에 결합된 항체의 수준과 비교하는 것을 포함하고, 여기서 결합된 항체의 수준은 시험 및 대조 샘플 내의 CD79b-발현 세포의 수로 표준화되고, 대조 샘플에 비해 시험 샘플 내의 결합된 항체의 수준이 더 높은 것은 CD79b를 발현하는 세포와 연관된 세포 증식성 장애의 존재를 나타낸다.
- [0426] 한 측면에서, 혈액 또는 혈청 내에서 가용형 CD79b를 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 B 세포 증식성 장애를 겪는 것으로 의심되는 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 시험 샘플을 본 발명의 항-CD79b 항체와 접촉시키고, 정상 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 대조 샘플에 비해 시험 샘플 내에서 가용형 CD79b의 증가를 검출하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 검출 방법은 포유동물의 혈액 또는 혈청 내에서 가용형 CD79b의 증가와 연관된 B 세포 증식성 장애를 진단하는 방법으로서 유용하다.
- [0427] 한 측면에서, 본 발명의 항체를 CD79b를 발현하는 세포에 결합시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 상기 세포를 본 발명의 항체와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 세포독성체에 접합된다. 한 실시태양에서, 항체는 성장 억제제에 접합된다.
- [0428] 본 발명의 방법은 CD79b의 발현과 연관된 임의의 적합한 병리학적 상태, 예를 들어 세포 및/또는 조직에 영향을 주기 위해 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 조혈 세포이다. 예를 들

어, 조혈 세포는 림프구, 백혈구, 혈소판, 적혈구 및 천연 킬러 세포로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 B 세포 또는 T 세포이다. 한 실시태양에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 암 세포이다. 예를 들어, 암 세포는 림프종 세포, 백혈병 세포, 또는 골수종 세포로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다.

[0429] 본 발명의 방법은 추가의 처리 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 방법은 표적화된 세포 및/또는 조직 (예를 들어, 암 세포)을 방사선 치료 또는 화학요법에 노출시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0430] 본원에서 설명되는 바와 같이, CD79b는 B 세포 수용체의 신호전달 성분이다. 따라서, 본 발명의 방법의 한 실시태양에서, 표적화되는 세포 (예를 들어, 암 세포)는 CD79b를 발현하지 않는 세포에 비해 CD79b가 발현되는 세포이다. 추가의 실시태양에서, 표적화되는 세포는 동일한 조직 종류의 정상적인 비-암 세포에 비해 CD79b 발현이 증강된 암 세포이다. 한 실시태양에서, 본 발명의 방법은 표적화된 세포의 사멸을 유발한다.

[0431] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항체의 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 임의의 상기 벡터를 함유하는 숙주 세포도 제공한다. 예를 들어, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이 세포, 또는 효모 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 항체를 생산하는 방법이 추가로 제공되고, 목적하는 항체의 발현에 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양하고, 세포 배양액으로부터 목적하는 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0432] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 항-CD79b 항체를 담체와 조합하여 포함하는 조성물에 관한 것이다. 임의로, 담체는 제약상 허용되는 담체이다.

[0433] 본 발명의 또다른 측면은 항-CD79b 폴리펩티드 항체에 반응성인 병태의 치료에 유용한 의약의 제조를 위한, 본원에서 설명되는 항-CD79b 폴리펩티드 항체의 용도에 관한 것이다.

[0434] 본 발명의 또다른 측면은 화학식 I의 항체-약물 화합물의 혼합물을 포함하는 조성물이고, 여기서 항체당 평균 약물 로드는 약 2 내지 약 5, 또는 약 3 내지 약 4이다.

[0435] 본 발명의 또다른 측면은 화학식 I의 ADC 화합물, 화학식 I의 ADC 화합물의 혼합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 제약상 허용되는 희석제, 담체, 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이다.

[0436] 또다른 측면은 화학식 I의 ADC 화합물 및 항암 특성 또는 다른 치료 효과를 갖는 제2 화합물을 포함하는 제약 조합 제제를 제공한다.

[0437] 또다른 측면은 종양 세포 또는 암 세포를 사멸시키거나 상기 세포의 증식을 억제하기에 효과적인 양의 화학식 I의 항체-약물 접합체, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 암 세포를 사멸시키거나 상기 세포의 증식을 억제하는 방법이다.

[0438] 또다른 측면은 환자에게 치료 유효량의 화학식 I의 ADC를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법이다.

[0439] 또다른 측면은 항체-약물 접합체, 용기, 및 치료를 표시하는 포장 삽입물 또는 라벨을 포함하는 제품, 즉, 키트를 포함한다.

[0440] 본 발명의 한 측면은 (a) 시스테인 조작된 항체의 조작된 시스테인기를 링커 시약과 반응시켜 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성시킨 다음, (b) Ab-L을 활성화된 약물 모이어티 D와 반응시켜, 항체-약물 접합체를 형성시키는 단계를 포함하거나; 또는 (c) 약물 모이어티의 친핵기를 링커 시약과 반응시켜 약물-링커 중간체 D-L을 형성시킨 다음, (d) D-L을 시스테인 조작된 항체의 조작된 시스테인기와 반응시켜, 항체-약물 접합체를 형성시키는 단계를 포함하는, 화학식 I의 항체 약물 접합체 화합물의 제조 방법이다.

[0441] 본 발명의 한 측면은 (a) 세포를 시스테인 조작된 항-CD79b 항체-약물 접합체에 노출시키고; (b) 시스테인 조작된 항-CD79b 항체-약물 접합체 화합물의 세포에 대한 결합 정도를 결정하는 것을 포함하는, 암 세포를 검출하기 위한 분석이다.

[0442] A. 항-CD79b 항체

[0443] 한 실시태양에서, 본 발명은 본원에서 치료제로서 사용될 수 있는 항-CD79b 항체를 제공한다. 예시적인 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 인간화, 이중특이적 및 이중접합체 항체를 포함한다.

[0444] 1. 폴리클로날 항체

- [0445] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 어쥬번트 (adjuvant)의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성시킬 수 있다. 관련 항원 (특히 합성 펩티드가 사용될 때)을 면역화되는 종에서 면역원성인 단백질에 접합시키는 것이 유용할 수 있다. 예를 들어, 항원은 2관능성제 또는 유도화제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서 R 및 R^1 은 상이한 알킬기임)을 사용하여, 키홀럼펫 헤모시아닌 (KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 및 대두 트립신 억제제에 접합될 수 있다.
- [0446] 동물은 예를 들어 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 접합체 (각각 토끼 또는 마우스에 대해)를 3 부피의 프로인트 (Freund) 완전 어쥬번트와 합한 후 용액을 다중 부위에 피내 주사함으로써 항원, 면역원성 접합체, 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1개월 후에, 동물은 프로인트 완전 어쥬번트 중의 펩티드 또는 접합체를 처음 양의 1/5 내지 1/10로 다중 부위에 피하 주사하여 부스터된다. 7일 내지 14일 후에, 동물에서 채혈하여 혈청의 항체 역가를 분석한다. 동물은 역가 평탄역까지 부스터한다. 접합체는 또한 단백질 용합체로서 재조합 세포 배양으로 제조될 수도 있다. 또한, 면역 반응을 증강시키기 위해 응집제, 예를 들어 명반을 적절하게 사용한다.
- [0447] 2. 모노클로날 항체
- [0448] 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다.
- [0449] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터는 면역화를 위해 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도하기 위해 상기 설명한 바와 같이 면역화된다. 별법으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 면역화 후에, 림프구는 단리된 후, 하이브리도마 세포를 형성하기 위해 적합한 용합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포주와 용합된다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).
- [0450] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 바람직하게는 용합되지 않은 모골수종 세포 (본원에서 용합 파트너로 칭함)의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 포함하는 적합한 배양 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모골수종 세포에 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우, 하이브리도마의 선택 배양 배지는 일반적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)를 포함할 것이고, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제한다.
- [0451] 바람직한 용합 파트너 골수종 세포는, 효율적으로 용합하고, 선택된 항체 생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 생성을 지지하고, 용합되지 않은 모세포에 대해 선택하는 선택 배지에 민감한 세포이다. 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 라인, 예를 들어 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 (슬크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고)) 및 SP-2 및 유도체, 예를 들어 X63-Ag8-653 세포 (아메리칸 타입 컬처 컬렉션)에서 유도된 것이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주도 인간 모노클로날 항체 생성을 위해 설명된 바 있다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; 및 [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).
- [0452] 하이브리도마 세포가 성장하는 배지는 항원에 대해 작용하는 모노클로날 항체의 생성에 대해 분석된다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해 결정한다.
- [0453] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]에 기재된 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0454] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론은 제한 회식 과정에 의해 서브클로닝하고 표준 방법 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))으로 성장시킬 수 있다. 상기 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 예를 들어 마우스 내로 세포의 i.p. 주사에 의해 동물에서 복수 종양으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.
- [0455] 서브클론에서 분리되는 모노클로날 항체는 통상적인 항체 정제 과정, 예를 들어 친화도 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로스 사용) 또는 이온-교환 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 등에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.

- [0456] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 단리되고 서열결정된다. 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원 역할을 한다. 일단 단리된 DNA는 발현 벡터에 삽입되고, 이 벡터는 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성하기 위해 본래 항체 단백질을 생성하지 않는 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포를 형질감염시킨다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 문헌은 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) 및 [Plueckthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)]을 포함한다.
- [0457] 추가의 실시태양에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편은 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에서는 파지 라이브러리를 사용하여 각각 무린 및 인간 항체의 단리를 설명하고 있다. 후속 문헌은 사슬 셔플링에 의한 고친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생성 (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), 및 매우 큰 파지 라이브러리 제조를 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합 (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993))을 설명하고 있다. 따라서, 이들 기술은 모노클로날 항체 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술의 실행가능한 대안이다.
- [0458] 항체를 코딩하는 DNA는 예를 들어 상동성 무린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 (C_H 및 C_L) 서열을 치환시키거나 (미국 특허 4,816,567; [Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 면역글로불린 코딩 서열을 비-면역글로불린 폴리펩티드 (이중 폴리펩티드)의 코딩 서열의 전부 또는 일부와 융합시킴으로써 키메라 또는 융합 항체 폴리펩티드를 생산하도록 변형시킬 수 있다. 비-면역글로불린 폴리펩티드 서열은 항체의 불변 도메인을 대체하거나, 항체의 한 항원 결합 부위의 가변 도메인을 대체하여 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원 결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 다른 항원 결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성시킨다.
- [0459] 3. 인간 및 인간화 항체
- [0460] 본 발명의 항-CD79b 항체는 추가로 인간화 항체 또는 인간 항체를 포함할 수 있다. 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 인간화 형태는 비-인간 면역글로불린에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬, 또는 그의 단편 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 인간화 항체는 수여자의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린 (수여 항체)을 포함한다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 대응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수여 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 면역글로불린의 CDR 영역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 FR 영역에 대응한다. 인간화 항체는 또한 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 일부의 대응 영역을 포함하는 것이 최적인 것이다 ([Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]).
- [0461] 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 그 내부에 비-인간으로부터 유도된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입된 것이다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 "도입 (import)" 잔기로서 종종 언급되고, 일반적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 대응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써 윈터 (Winter) 등의 방법 ([Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 상기 "인간화" 항체는 무순상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간종의 대응하는 서열로 대체된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.
- [0462] 인간화 항체 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항체가 인간 치료용으로 의도될 때 항원성 및 HAMA (인간 항-마우스 항체) 반응의 감소를 위해 매우 중요하다. HAMA 반응의 감소 또는 제거는 임상적 적합한 치료제의 개발에서 유의한 측면이다 (예를 들어, 문헌 [Khazzaeli 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] 참조). 본원에서 설명되는 바와 같이, 본 발명은 HAMA 반응이 감소되거나 제거되도록 인간화된 항체를 제공한다. 이들 항체의 변이체는 또한 그 일부가 아래에서 추가로 설명되는, 당업계에서 공지된 통상적인 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 소위 "최적 맞춤 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열은 공지의 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 설치류와 가장 근접한 인간 V 도메인 서열이 확인되고, 그 안의 인간 프레임워크 영역 (FR)이 인간화 항체에 대해 허용된다 ([Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래한 특정 프레임워크 영역을 이용한다. 동일한 프레임워크가 복수 개의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 ([Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)]).

[0463] 예를 들어, 본원에서 설명되는 바와 같은 항체로부터의 아미노산 서열은 프레임워크 및/또는 추가변 서열(들)의 다양성을 위한 출발 (모) 서열로서 기능할 수 있다. 출발 추가변 서열이 연결되는 선택된 프레임워크 서열은 본원에서 엑셉터 인간 프레임워크로서 언급된다. 엑셉터 인간 프레임워크가 인간 면역글로불린 (그의 VL 및/또는 VH 영역)의 것이거나 이로부터 유도된 것일 수 있지만, 엑셉터 인간 프레임워크는 인간 컨센서스 프레임워크 서열의 것이거나 이로부터 유도되는 것이 바람직하고, 그 이유는 상기 프레임워크가 인간 환자에서 최소의 면역 원성을 갖거나 또는 전혀 갖지 않는 것으로 입증되었기 때문이다.

[0464] 엑셉터가 인간 면역글로불린으로부터 유도되는 경우에, 공여체 프레임워크 서열을 인간 프레임워크 서열의 집합체 내의 다양한 인간 프레임워크 서열과 정렬시킴으로써 공여체 프레임워크 서열에 대한 그의 상동성을 기초로 하여 선택된 인간 프레임워크 서열을 임의로 선택하고, 가장 상동성인 프레임워크 서열을 엑셉터로서 선택할 수 있다.

[0465] 한 실시태양에서, 본원에서 인간 컨센서스 프레임워크는 VH 하위군 III 및/또는 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열의 것이거나 이로부터 유도되는 것이다.

[0466] 따라서, VH 엑셉터 인간 프레임워크는 다음 프레임워크 서열 중의 1, 2, 3개 또는 전부를 포함할 수 있다:

[0467] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 143)를 포함하는 FR1,

[0468] WVRQAPGKGLEWV (서열 144)를 포함하는 FR2,

[0469] RFTISX₁DX₂SKNTX₃YLMNSLRAEDTAVYYC (서열 147)를 포함하는 FR3 (여기서, X₁은 A 또는 R이고, X₂는 T 또는 N이고, X₃은 A 또는 L임),

[0470] WGQGTLTVSS (서열 146)를 포함하는 FR4.

[0471] VH 컨센서스 프레임워크의 예는 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 108); 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 109-111); 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 112); 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 113-115); 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 116); 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 117-119); 인간 VH 엑셉터 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 120); 인간 VH 엑셉터 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 121-122); 인간 VH 엑셉터 2 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 123); 또는 인간 VH 엑셉터 2 프레임워크 마이너스 연장된 추가변 영역 (서열 124-126)을 포함한다.

[0472] 한 실시태양에서, VH 엑셉터 인간 프레임워크는 다음 프레임워크 서열 중의 1, 2, 3개 또는 전부를 포함할 수 있다:

[0473] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 143)를 포함하는 FR1,

[0474] WVRQAPGKGLEWV (서열 144)를 포함하는 FR2,

[0475] RFTISADTSKNTAYLMNSLRAEDTAVYYC (서열 145),

- [0476] RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (서열 148),
- [0477] RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열 149),
- [0478] RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (서열 150), 또는
- [0479] RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (서열 151)을 포함하는 FR3,
- [0480] WGQGLTVTVSS (서열 146)를 포함하는 FR4.
- [0481] VL 엑셉터 인간 프레임워크는 다음 프레임워크 서열 중의 1, 2, 3개 또는 전부를 포함할 수 있다:
- [0482] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 139)를 포함하는 FR1,
- [0483] WYQQKPGKAPKLLIY (서열 140)를 포함하는 FR2,
- [0484] GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (서열 141)를 포함하는 FR3,
- [0485] FGQGKVEIKR (서열 142)을 포함하는 FR4.
- [0486] VL 컨센서스 프레임워크의 예는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 (서열 127); 인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 (서열 128); 인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 (서열 129); 또는 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 (서열 130)를 포함한다.
- [0487] 인간 면역글로불린으로부터의 것이든 인간 컨센서스 프레임워크로부터의 것이든 상관없이 엑셉터는 선택되는 인간 프레임워크 서열과 서열이 동일할 수 있지만, 본 발명은 엑셉터 서열이 인간 면역글로불린 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열에 비해 기존재하는 아미노산 치환을 포함할 수 있음을 고려한다. 상기 기존재하는 치환은 인간 면역글로불린 서열 또는 컨센서스 프레임워크 서열에 비해 바람직하게는 최소로; 대체로 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이만으로 존재한다.
- [0488] 비-인간 항체의 추가변 영역 잔기는 VL 및/또는 VH 엑셉터 인간 프레임워크 내로 통합된다. 예를 들어, 카바트 CDR 잔기, 코티아 추가변 루프 잔기, Abm 잔기, 및/또는 접촉 잔기에 대응하는 잔기를 통합시킬 수 있다. 임의로, 다음과 같은 연장된 추가변 영역 잔기가 통합된다: 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 26-35B (H1), 50-65, 47-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3).
- [0489] 추가변 영역 잔기의 "통합"이 본원에서 논의되지만, 이것은 다양한 방식으로 수행될 수 있고, 예를 들어 목적하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 그의 프레임워크 잔기가 엑셉터 인간 프레임워크 잔기로 변경되도록 마우스 가변 도메인 서열을 코딩하는 핵산을 돌연변이시킴으로써, 또는 추가변 도메인 잔기가 비-인간 잔기로 변경되도록 인간 가변 도메인 서열을 코딩하는 핵산을 돌연변이시킴으로써, 또는 목적하는 서열을 코딩하는 핵산을 합성함으로써 등을 통해 생성될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0490] 본원의 실시예에서, 추가변 영역-이식된 변이체는 각각의 추가변 영역에 대해 별개의 올리고뉴클레오타이드를 사용하는, 인간 엑셉터 서열을 코딩하는 핵산의 Kunkel 돌연변이 유발에 의해 생성하였다 (Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)). 적합한 추가변 영역-항원 상호작용을 교정하고 재-확립하기 위해 통상적인 기술을 이용하여, 프레임워크 및/또는 추가변 영역 내에 적절한 변화를 도입할 수 있다.
- [0491] 파지(미드) 디스플레이 (본원에서 일부 문맥에서 파지 디스플레이로도 칭함)가 서열 무작위화 (randomization)에 의해 생성된 라이브러리에서 많은 상이한 잠재적인 변이체 항체를 생성하고 스크리닝하기 위한 편리하고 신속한 방법으로서 사용될 수 있다. 그러나, 변경된 항체를 제조하고 스크리닝하기 위한 다른 방법이 당업자에게 이용가능하다.
- [0492] 파지(미드) 디스플레이 기술은 리간드, 예를 들어 항원에 결합하는 신규한 단백질을 생성하고 선택하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지(미드) 디스플레이 기술을 사용함으로써, 표적 분자에 높은 친화도로 결합하는 서열에 대해 신속하게 분류될 수 있는 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 일반적으로 바이러스 코트 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 융합된다. 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열이 유전자 III 단백질의 일부를 코딩하는 핵산 서열에 융합된 일가 파지미드 디스플레이 시스템이 개발되었다 ([Bass, S., Proteins, 8:309 (1990)]; [Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3:205 (1991)]). 일가 파지미드 디스플레이 시스템에서, 유전자 융합체는 낮은 수준으로 발현되고, 입자의 감염성이 유지되도록 야생형 유전자 III 단백질도 발현된다. 펩티드 라이브러리를 생성하고 이들 라이브러리를 스크리닝하는 방법은 많은 특

허 (예를 들어 미국 특허 5,723,286, 미국 특허 5,432,018, 미국 특허 5,580,717, 미국 특허 5,427,908 및 미국 특허 5,498,530)에 개시되어 있다.

[0493] 무작위 DNA 서열의 삽입에 의한 단일 유전자의 변경 또는 관련 유전자 패밀리의 클로닝에 의한 것을 포함하는 많은 방식을 통해 항체 또는 항원 결합 폴리펩티드의 라이브러리가 제조되었다. 파지(미드) 디스플레이를 사용하여 항체 또는 항원 결합 단백을 디스플레이하는 방법은 미국 특허 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, 및 5,658,727에 기재되어 있다. 이어서, 라이브러리는 목적하는 특징을 갖는 항체 또는 항원 결합 단백질의 발현에 대해 스크리닝된다.

[0494] 선택되는 아미노산을 주형 핵산 내로 치환시키는 방법은 당업계에서 잘 확립되어 있고, 그 일부가 본원에서 설명된다. 예를 들어, 초가변 영역 잔기는 Kunkel 방법을 이용하여 치환될 수 있다 (예를 들어, [Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)] 참조).

[0495] 올리고뉴클레오타이드의 서열은 변경되는 초가변 영역에 대한 하나 이상의 설계된 코돈 세트를 포함한다. 코돈 세트는 목적하는 변이체 아미노산을 코딩하도록 사용된 상이한 뉴클레오타이드 삼중체 서열의 세트이다. 코돈 세트는 IUB 코드에 따라 아래 나타낸 바와 같이 특정 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 등물 혼합물을 지정하기 위해 기호를 사용하여 나타낼 수 있다.

[0496] IUB 코드

[0497] G 구아닌

[0498] A 아데닌

[0499] T 티민

[0500] C 시토신

[0501] R (A 또는 G)

[0502] Y (C 또는 T)

[0503] M (A 또는 C)

[0504] K (G 또는 T)

[0505] S (C 또는 G)

[0506] W (A 또는 T)

[0507] H (A 또는 C 또는 T)

[0508] B (C 또는 G 또는 T)

[0509] V (A 또는 C 또는 G)

[0510] D (A 또는 G 또는 T)

[0511] N (A 또는 C 또는 G 또는 T)

[0512] 예를 들어, 코돈 세트 DVK에서, D는 뉴클레오타이드 A 또는 G 또는 T일 수 있고; V는 A 또는 G 또는 C일 수 있고; K는 G 또는 T일 수 있다. 상기 코돈 세트는 18가지의 상이한 코돈을 제시할 수 있고, 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, 및 Cys를 코딩할 수 있다.

[0513] 올리고뉴클레오타이드 또는 프라이머 세트는 표준 방법을 이용하여 합성할 수 있다. 코돈 세트에 의해 제공되는 뉴클레오타이드 삼중체의 모든 가능한 조합을 나타내고, 목적하는 군의 아미노산을 코딩하는 서열을 함유하는 올리고뉴클레오타이드의 세트는 예를 들어 고체상 합성에 의해 합성할 수 있다. 특정 위치에서 선택된 뉴클레오타이드 "다의성 (degeneracy)"을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 합성은 당업계에서 잘 공지되어 있다. 특정 코돈 세트를 갖는 상기 뉴클레오타이드 세트는 시판 핵산 합성기 (예를 들어, 어플라이드 바이오시스템즈로부터 입수가 가능함)를 사용하여 합성할 수 있거나, 상업적으로 입수할 수 있다 (예를 들어, 라이프 테크놀로지스 (Life Technologies, 미국 매릴랜드주 록빌)로부터). 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성된 올리고뉴클레오타이드의 세트는 대개 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오타이드를 포함할 것이고, 상기 차이는 전체 서열 내에서 코돈 세트에 의해 확립된다. 본 발명에 따라 사용될 때 올리고뉴클레오타이드는 가변 도메인 핵산 주형에 혼성화를 허용하는 서

열을 갖고, 또한 클로닝 목적을 위한 제한 효소 부위를 포함할 수 있다.

- [0514] 한 방법에서, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열은 올리고뉴클레오타이드-매개된 돌연변이 유발에 의해 생성될 수 있다. 상기 기술은 문헌 [Zoller et al., Nucleic Acids Res. 10:6487-6504 (1987)]에 기재된 바와 같이 당업계에서 잘 공지되어 있다. 간단히 설명하면, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열은 목적하는 코돈 세트를 코딩하는 올리고뉴클레오타이드 세트를 DNA 주형에 혼성화함으로써 생성되고, 여기서 주형은 가변 영역 핵산 주형 서열을 함유하는 단일 가닥 형태의 플라스미드이다. 혼성화 후, DNA 중합효소를 사용하여 주형의 전체 제 2 상보성 가닥을 합성하고, 이는 따라서 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함할 것이고, 올리고뉴클레오타이드 세트에 의해 제공되는 바와 같은 코돈 세트를 함유할 것이다.
- [0515] 일반적으로, 길이가 적어도 25개 뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드가 사용된다. 최적 올리고뉴클레오타이드는 돌연변이(들)을 코딩하는 뉴클레오타이드(들)의 측면 상에서 주형에 완전히 상보적인 12 내지 15개의 뉴클레오타이드를 가질 것이다. 이는 올리고뉴클레오타이드가 단일 가닥 DNA 주형 분자에 적절하게 혼성화할 것을 보장한다. 올리고뉴클레오타이드는 문헌 [Crea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)]에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 기술을 사용하여 쉽게 합성된다.
- [0516] DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터로부터 유래된 벡터 (상업적으로 이용가능한 M13mp18 및 M13mp19 벡터가 적합함), 또는 문헌 [Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)]에 설명된 바와 같이 단일 가닥 파지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성된다. 따라서, 돌연변이시킬 DNA를, 단일 가닥 주형을 생성하기 위해 상기 벡터 중 하나에 삽입시킬 수 있다. 단일 가닥 주형의 생산은 상기 문헌 [Sambrook et al.]의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.
- [0517] 천연 DNA 서열을 변경시키기 위해, 올리고뉴클레오타이드를 적합한 혼성화 조건 하에 단일 가닥 주형에 혼성화시킨다. 이어서, DNA 중합효소, 보통 T7 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I의 Klenow 단편을 첨가하여, 합성을 위한 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 주형의 상보성 가닥을 합성한다. 따라서, DNA의 하나의 가닥이 유전자 1의 돌연변이형을 코딩하고, 다른 가닥 (원래의 주형)이 유전자 1의 천연의 비변경된 서열을 코딩하도록 이중이중체 분자가 형성된다. 이어서, 상기 이중이중체 분자를 적합한 숙주 세포, 보통 원핵세포, 예를 들어 이. 콜라이 JM101 내로 형질전환시킨다. 세포를 성장시킨 후, 아가로스 플레이트 상에 플레이팅하고, 돌연변이된 DNA를 함유하는 박테리아 콜로니를 확인하기 위해 32-포스페이트로 방사성 표지된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 스크리닝한다.
- [0518] 바로 앞에 설명된 방법은 플라스미드의 두 가닥이 모두 돌연변이(들)을 함유하는 동중이중체 분자가 생성되도록 변형될 수 있다. 변형은 다음과 같다: 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 상기 설명된 바와 같이 단일 가닥 주형에 어닐링시킨다. 3가지 데옥시리보뉴클레오타이드, 즉, 데옥시리보아데노신 (dATP), 데옥시리보구아노신 (dGTP), 및 데옥시리보티미딘 (dT)의 혼합물을 dCTP-(aS)로 불리는 변형된 티오데옥시리보시토신 (아머샴 (Amersham)으로부터 입수가가능함)과 합한다. 상기 혼합물을 주형-올리고뉴클레오타이드 복합체에 첨가한다. DNA 중합효소를 상기 혼합물에 첨가하면, 돌연변이된 염기를 제외하고 주형에 동일한 DNA의 가닥이 생성된다. 또한, 상기 새로운 DNA 가닥은 dCTP 대신에 dCTP-(aS)를 함유할 것이고, 이는 제한 엔도뉴클레아제 소화로부터 보호하는 기능을 한다. 이중가닥 이중이중체의 주형 가닥을 적절한 제한 효소로 절단한 후, 주형 가닥을 ExoIII 뉴클레아제 또는 다른 적절한 뉴클레아제로 돌연변이를 유발시킬 부위(들)을 함유하는 영역을 지나서 소화시킬 수 있다. 이어서, 반응을 중지시켜 단지 부분적으로 단일 가닥인 분자를 생성시킨다. 이어서, 4가지의 모든 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, ATP, 및 DNA 리가제의 존재 하에 DNA 중합효소를 사용하여 완전 이중가닥 DNA 동중이중체를 형성한다. 이어서, 상기 동중이중체 분자를 적합한 숙주 세포 내로 형질전환시킬 수 있다.
- [0519] 앞서 나타난 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 세트의 서열은 주형 핵산에 혼성화하기에 충분한 길이이고, 또한 반드시 아니지만 제한 부위를 함유할 수 있다. DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터로부터 유래된 벡터, 또는 문헌 [Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)]에 설명된 바와 같이 단일 가닥 파지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 돌연변이시킬 DNA를 단일 가닥 주형을 생성하기 위해 상기 벡터 중 하나에 삽입되어야 한다. 단일 가닥 주형의 생산은 상기 문헌 [Sambrook et al.]의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.
- [0520] 다른 방법에 따르면, 항원 결합은 복구된 추가변 영역의 선택을 통한 항체의 인간화 동안 회복될 수 있다 (2005년 2월 18일 출원된 미국 특허 출원 11/061,841 참조). 이 방법은 비-인간 추가변 영역을 엑셉터 프레임워크 상에 통합시키고, 엑셉터 프레임워크 서열을 변형시키지 않으면서 하나 이상의 추가변 영역에 하나 이상의 아미

노산 치환을 추가로 도입시키는 것을 포함한다. 별법으로, 하나 이상의 아미노산 치환의 도입에는 억셉터 프레임워크 서열의 변형이 동반될 수 있다.

[0521] 다른 방법에 따르면, 각각의 세트가 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오타이드를 갖는 상류 및 하류 올리고뉴클레오타이드 세트를 제공함으로써 라이브러리를 생성시킬 수 있고, 상기 상이한 서열은 올리고뉴클레오타이드의 서열 내에 제공된 코돈 세트에 의해 확립된다. 상류 및 하류 올리고뉴클레오타이드 세트는 가변 도메인 주형 핵산 서열과 함께 중합효소 연쇄 반응에서 사용되어 PCR 산물의 "라이브러리"를 생성할 수 있다. PCR 산물은 확립된 분자 생물학 기술을 이용하여 다른 관련 또는 비관련 핵산 서열, 예를 들어, 바이러스 코트 단백질 및 이량체화 도메인과 융합될 수 있으므로 "핵산 카세트"로서 언급될 수 있다.

[0522] PCR 프라이머의 서열은 초가변 영역 내의 용매 접근가능한 매우 다양한 위치에 대해 하나 이상의 설계된 코돈 세트를 포함한다. 상기한 바와 같이, 코돈 세트는 목적하는 변이체 아미노산을 코딩하기 위해 사용되는 상이한 뉴클레오타이드 삼중체 서열의 세트이다.

[0523] 적절한 스크리닝/선택 단계를 통해 선택되는, 목적하는 기준을 충족시키는 항체 선택체는 표준 재조합 기술을 사용하여 단리되고 클로닝될 수 있다.

[0524] 항체가 항원에 대한 높은 결합 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것이 더욱 중요하다. 이를 달성하기 위해서, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석의 과정에 의해 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수가능하고, 당업자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태 구조를 그리고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이를 조사하면 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 끼치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 목적하는 항체 특성, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 대한 영향에 직접적으로 가장 실질적으로 관련된다.

[0525] 다양한 형태의 인간화 항-CD79b 항체가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체는 면역접합체를 생성하기 위해 하나 이상의 세포독성제(들)과 임의로 접합된 항체 단편, 예를 들어 Fab일 수 있다. 별법으로, 인간화 항체는 무손상 항체, 예를 들어 무손상 IgG1 항체일 수 있다.

[0526] 인간화에 대한 대안으로서, 인간 항체를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 면역화시에 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 현재 생산할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 (germ-line) 돌연변이체 마우스의 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자의 동종접합성 결실은 내인성 항체 생성을 완전히 억제하는 것으로 설명되었다. 그러한 생식계열 돌연변이체 마우스 내로 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이를 전달하면 항원 시험 접종시에 인간 항체를 생산할 것이다 (예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993)]; 미국 특허 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (모두 젠팜 (GenPharm)); 5,545,807; 및 WO 97/17852 참조).

[0527] 별법으로, 파지 디스플레이 기술 (McCafferty et al., Nature 348: 552-553 [1990])을 사용하여, 비면역화된 공여체로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로 부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관 내에서 생산할 수 있다. 상기 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트형 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 주 또는 부 코트 단백질 유전자 내로 인-프레임으로 클로닝되고, 파지 입자의 표면 상에 기능성 항체 단편으로서 디스플레이된다. 필라멘트형 입자는 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 카피를 포함하므로, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 또한 이들 특성을 보이는 항체를 코딩하는 유전자를 선택하는 것이다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성의 일부를 모방한다. 파지 디스플레이는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993)]에 검토된 다양한 포맷으로 수행할 수 있다. V-유전자 세그먼트의 복수의 공급원을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양성 어레이를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여체로부터 V 유전자의 레퍼토리를 제조할 수 있고, 항원 (자가항원 포함)의 다양성 어레이에 대한 항체는 본질적으로 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 단리할 수 있다 (또한, 미국 특허 5,565,332 및 5,573,905 참조).

- [0528] 상기 논의한 바와 같이, 인간 항체는 또한 시험관 내 활성화된 B 세포에 의해 생성할 수 있다 (미국 특허 5,567,610 및 5,229,275 참조).
- [0529] 4. 항체 단편
- [0530] 특정 상황에서, 전체 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 보다 작은 크기로 인해 신속한 소실이 가능하고, 고형 종양에 대한 접근성을 개선시킬 수 있다.
- [0531] 항체 단편의 생산을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백 분해 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어, [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산할 수 있다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되어 분비될 수 있고, 이에 의해 다량의 이들 단편을 쉽게 생산할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의한 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). 다른 방법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리할 수 있다. 셀비지 (salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체 내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 미국 특허 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시태양에서, 선택되는 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458 참조). Fv 및 scFv는 불변 영역이 결합된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종류이고; 따라서 생체 내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합하다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 효과기 단백질의 융합체를 생성하도록 제조될 수 있다 (Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌). 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 그러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.
- [0532] 5. 이중특이적 항체
- [0533] 이중특이적 항체는 적어도 2종의 상이한 에피토프에 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 본원에 설명된 CD79b 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 그러한 항체는 CD79b 결합 부위를 다른 단백질에 대한 결합 부위와 조합할 수 있다. 별법으로, 항-CD79b 아암 (arm)은 CD79b-발현 세포에 대한 세포성 방어 메커니즘에 집중하고 편재시키기 위해, 백혈구 상의 촉발 분자, 예를 들어 T-세포 수용체 분자 (예를 들어 CD3), 또는 IgG의 Fc 수용체 (FcγR), 예를 들어 FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) 및 FcγRIII (CD16)에 결합하는 아암과 조합될 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 CD79b를 발현하는 세포에 편재시키기 위해 사용할 수 있다. 이들 항체는 CD79b-결합 아암, 및 세포 독성제 (예를 들어 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토크세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 아암을 갖는다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어 F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로서 제조할 수 있다.
- [0534] WO 96/16673에서는 이중특이적 항-ErbB2/항-FcγRIII 항체를 설명하고, 미국 특허 5,837,234에서는 이중특이적 항-ErbB2/항-FcγRI 항체를 설명한다. 이중특이적 항-ErbB2/Fcα 항체는 WO 98/02463에 제시되어 있다. 미국 특허 5,821,337에서는 이중특이적 항-ErbB2/항-CD3 항체를 교시하고 있다.
- [0535] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 사슬은 상이한 특이성을 갖는다 (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류 때문에, 이들 하이브리도마 (쿠아드로마 (quadroma))는 그 중 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 대체로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 성가시고 생산 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 문헌 [Trautner et al., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.
- [0536] 상이한 방법에 따라, 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)를 갖는 항체 가변 도메인을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 바람직하게는, 융합은 힌지의 적어도 일부, C_H2 및 C_H3 영역을 포함하는 Ig 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (C_H1)이 융합체의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및 필요한 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 세포 내로 동시형질감염시킨다. 이는 제작에 사용된 3개의 플리펙티드 사슬의 불균등한 비율이 목적하는 이중특이적 항체의 최적 수율을 제공하는 실시태양에서 3개의

폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 큰 탄력성을 제공한다. 그러나, 균등 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬의 발현이 고수율을 생산할 때 또는 상기 비가 목적하는 사슬 조합의 생성에 유의한 영향을 갖지 않을 때, 단일 발현 벡터 내에 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드 사슬의 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0537] 상기 방법의 바람직한 실시태양에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하는 것이 손쉬운 분리 방법을 제공하므로, 상기 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린 사슬 조합물로부터 목적하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 상기 방법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 추가의 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0538] 미국 특허 5,731,168에 기재된 다른 방법에 따라, 한쌍의 항체 분자들 사이의 계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 비율을 최대화하도록 처리될 수 있다. 바람직한 계면은 C_{43} 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예, 티로신 또는 트립토판)으로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예, 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써, 큰 측쇄(들)과 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티 (cavity)"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치않는 최종 생성물, 예를 들어 동종이량체 (homodimer)에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다.

[0539] 이중특이적 항체는 가교결합된 또는 "이중접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 그러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089) 제안되었다. 이중접합체 항체는 임의의 통상적인 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 적합한 가교결합제는 당업계에 잘 알려져 있고, 많은 가교결합 기술과 함께 미국 특허 4,676,980에 개시되어 있다.

[0540] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 문헌에서 설명되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 연결기를 이용하여 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]에서는 무손상 항체가 단백 분해 방식으로 절단되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차를 기술하고 있다. 이들 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지하기 위해 디티올 착화제인 아비소산나트륨의 존재 하에 환원된다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab' -TNB 유도체 중 하나는 머캅토에틸아민으로 환원시켜 Fab' -티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab' -TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로서 사용할 수 있다.

[0541] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab' -SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]에서는 완전 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생산을 기술하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 따로 분리시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관 내에서 유도 화학 커플링 반응시켰다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0542] 이중특이적 항체 단편을 재조합 세포 배양액으로부터 직접 제조하고 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 설명되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다 (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 영역에서 환원되어 단량체를 형성한 후, 재산화되어 항체 이중이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 이용할 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 다른 메카니즘을 제공하였다. 이 단편은 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 V_L 에 연결된 V_H 를 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 다른 단편의 상보성 V_L 및 V_H 도메인과 페어링하고, 이에 의해 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이중특이적 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다 ([Gruber et al., J.

Immunol., 152:5368 (1994)] 참조).

[0543] 이가 초과인 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 (Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)).

[0544] 6. 이중접합체 항체

[0545] 또한, 이중접합체 항체가 본 발명의 범위 내에 있다. 이중접합체 항체는 2개의 공유연결된 항체로 이루어진다. 그러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 대해 표적화시키기 위해 [미국 특허 4,676,980], 및 HIV 감염의 치료를 위해 [WO 91/00360 및 WO 92/200373; EP 03089] 제안되었다. 항체는 가교결합제를 수반하는 것을 포함한, 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 사용하여 시험관 내에서 제조할 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 면역독소는 디설파이드 교환 반응을 이용하여, 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트와 예를 들어 미국 특허 4,676,980에 개시된 것을 포함한다.

[0546] 7. 다가 항체

[0547] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 이가 항체보다 빠르게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 항원 결합 부위가 3개 이상인 (예를 들어 4가 항체) 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것)일 수 있고, 이는 항체의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생산될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이로 이루어진다). 상기 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원에서 바람직한 다가 항체는 3 내지 약 8개, 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이로 이루어진다). 다가 항체는 적어도 하나의 폴리펩티드 사슬 (바람직하게는 2개의 폴리펩티드 사슬)을 포함하고, 여기서 폴리펩티드 사슬(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc (여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, Fc는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1이다)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 VH-CH1-가교성 링커-VH-CH1-Fc 영역 사슬; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역 사슬을 포함할 수 있다. 본원에서 다가 항체는 바람직하게는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원에서 다가 항체는 예를 들어 약 2 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 추가로 포함한다.

[0548] 8. 효과기 기능 조작

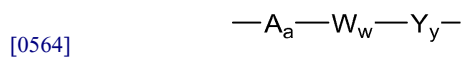
[0549] 예를 들어 항체의 항원 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 향상시키도록 효과기 기능에 관하여 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 시스테인 잔기(들)이 Fc 영역 내에 도입되어, 상기 영역 내에서 사슬내 디설파이드 결합을 형성할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체 매개 세포 사멸 및 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다 ([Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)] 참조). 향상된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체성 항체도 또한 문헌 [Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같은 이중2관능성 가교결합기를 사용하여 제조할 수 있다. 별법으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체는 조작될 수 있고, 그에 의해 향상된 보체 분해 및 ADCC 능력을 가질 수 있다 ([Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)] 참조). 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 5,739,277에 기재된 바와 같이 셀비지 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편) 내로 포함시킬 수 있다. 본원에서 사용될 때, 용어 "셀비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 나타낸다.

[0550] 9. 면역접합체

[0551] 본 발명은 또한 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 결합된 항체를 포함하는 면역접합체 (상호교환가능하게 "항체-약물 접합체", 또는 "ADC"로서 언급됨)에 관한 것이다.

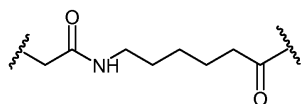
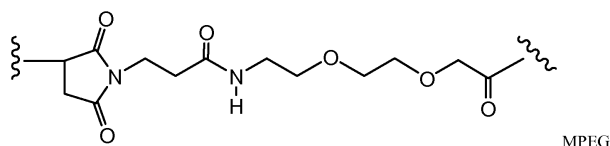
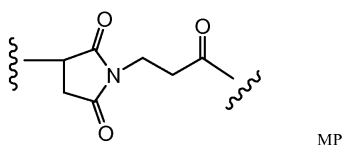
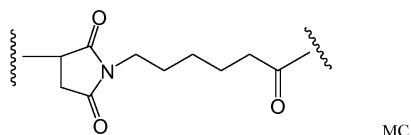
- [0552] 특정 실시태양에서, 면역접합체는 항체 및 화학요법제 또는 다른 독소를 포함한다. 그러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 상기 기재되어 있다. 사용할 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAPI-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 다양한 방사선 핵종이 이용가능하다. 그 예는 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , 및 ^{186}Re 를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜티오) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피메이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이팅제이다. WO 94/11026을 참조한다.
- [0553] 항체 및 하나 이상의 작은 분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 아우리스타틴 펩티드, 예를 들어 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체), 메이탄시노이드, 예를 들어 DM1, 트리코텐, 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에서 고려된다.
- [0554] 예시적인 면역접합체 - 항체-약물 접합체
- [0555] 본 발명의 면역접합체 (또는 "항체-약물 접합체" ("ADC"))는 아래 화학식 I의 것일 수 있고, 여기서 항체는 선택적인 링커 (L)을 통해 하나 이상의 약물 모이어티 (D)에 접합된다 (즉, 공유결합에 의해 부착된다). ADC는 thioMab 약물 접합체 ("TDC")를 포함할 수 있다.
- [0556] <화학식 I>
- [0557] $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$
- [0558] 따라서, 항체는 직접 또는 링커를 통해 약물에 접합될 수 있다. 화학식 I에서, p는 항체당 약물 모이어티의 평균 수이고, 이는 예를 들어 항체당 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티, 특정 실시태양에서 항체당 1 내지 약 8개의 약물 모이어티일 수 있다. 본 발명은 화학식 I의 항체-약물 화합물의 혼합물을 포함하는 조성물을 포함하고, 여기서 항체당 평균 약물 로딩은 약 2 내지 약 5, 또는 약 3 내지 약 4이다.
- [0559] a. 예시적인 링커
- [0560] 링커는 하나 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질 옥시카르보닐 ("PAB"), 및 링커 시약과 접합으로부터 생성된 것; N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카복실레이트 ("SMCC", 본원에서 "MCC"로도 칭함), 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")를 포함한다. 다양한 링커 성분은 당업계에 공지되어 있고, 일부를 아래에 기재한다.
- [0561] 링커는 세포에서 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정 링커 (예를 들어, 히드라존), 프로테아제-감수성 (예를 들어, 펩티다제-감수성) 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드 함유 링커 ([Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 5,208,020)를 사용할 수 있다.
- [0562] 특정 실시태양에서, 링커는 하기 화학식 II에 제시된 바와 같다:

[0563] <화학식 II>



[0565] 식에서, A는 스트레처 (stretcher) 단위이고, a는 0 내지 1의 정수이고; W는 아미노산 단위이고, w는 0 내지 12의 정수이고; Y는 스페이서 단위이고, y는 0, 1, 또는 2이고; Ab, D, 및 p는 화학식 I에서 상기 정의되어 있다. 그러한 링커의 예시적인 실시태양은 본원에 참조로 명백하게 포함되는 US 2005-0238649 A1에 기재되어 있다.

[0566] 일부 실시태양에서, 링커 성분은 항체를 다른 링커 성분 또는 약물 모이어티에 연결시키는 "스트레처 단위"를 포함할 수 있다. 예시적인 스트레처 단위를 아래에 제시한다 (여기서, 물결선은 항체에 대한 공유결합에 의한 부착의 부위를 나타낸다):



[0567]

[0568] 일부 실시태양에서, 링커 성분은 아미노산 단위를 포함할 수 있다. 하나의 그러한 실시태양에서, 아미노산 단위는 프로테아제에 의한 링커의 절단을 허용하여, 세포내 프로테아제, 예를 들어 라이소좀 효소에 대한 노출시에 면역접합체로부터 약물 방출을 용이하게 한다 (예를 들어, 문헌 [Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784] 참조). 예시적인 아미노산 단위는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 및 펜타펩티드를 포함하고 이에 제한되지 않는다. 예시적인 디펩티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe); 페닐알라닌-리신 (fk 또는 phe-lys); 또는 N-메틸-발린-시트룰린 (Me-val-cit)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 단위는 천연 발생 아미노산 잔기 및 소수 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함할 수 있다. 아미노산 단위는 특정 효소, 예를 들어 종양-연관 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그들의 선택성 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

[0569]

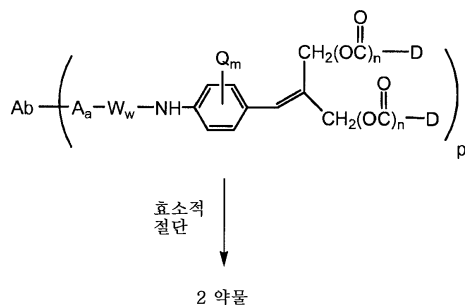
일부 실시태양에서, 링커 성분은 항체를 약물 모이어티에 직접 또는 스트레처 단위 및/또는 아미노산 단위에 의해 연결시키는 "스페이서" 단위를 포함할 수 있다. 스페이서 단위는 "자가 희생적" 또는 "비-자가 희생적"일 수 있다. "비-자가 희생적" 스페이서 단위는 그의 일부 또는 모두가 ADC의 효소에 의한 (예를 들어, 단백질 분해에 의한) 절단에 약물 모이어티에 결합된 상태로 유지되는 단위이다. 비-자가 희생적 스페이서 단위의 예는 글리신 스페이서 단위 및 글리신-글리신 스페이서 단위를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 서열-특이적인 효소에 의한 절단에 감수성인 펩티드성 스페이서의 다른 조합도 또한 고려된다. 예를 들어, 종양 세포 관련 프로테아제에 의한, 글리신-글리신 스페이서 단위를 함유하는 ADC의 효소에 의한 절단은 ADC의 나머지에서부터 글리신-글리신-약물 모이어티를 방출시킬 것이다. 이어서, 하나의 그러한 실시태양에서, 글리신-글리신-약물 모이어티는 종양 세포 내에서 별도의 가수분해 단계를 거치고, 이에 의해 글리신-글리신 스페이서 단위를 약물 모이어티로부터 절단한다.

[0570]

"자가 희생적" 스페이서 단위는 별도의 가수분해 단계를 수행하지 않으면서 약물 모이어티를 방출시킨다. 특정 실시태양에서, 링커의 스페이서 단위는 p-아미노벤질 단위를 포함한다. 하나의 그러한 실시태양에서, p-아미노벤질 알콜은 아마이드 결합을 통해 아미노산 단위에 부착되고, 카르바메이트, 메틸카르바메이트, 또는 카르보네이트가 벤질 알콜과 세포독성제 사이에 형성된다 (예를 들어, 문헌 [Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103] 참조). 한 실시태양에서, 스페이서 단위는 p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB)이다. 특정 실시태양에서, p-아미노 벤질 단위의 페닐렌 부분은 Q_m으로 치환되고, 여기서 Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이다. 자가 희생적 스페이서 단위의 예는 p-아미노벤질 알콜에 전기적으로 유사한 방향족 화합물 (예를 들어, US 2005/0256030 A1 참조), 예를 들어 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 추가로 포함하고 이로 제한되지 않는다. 아마이드 결합 가수분해시에 고리화되는 스페이서, 예를 들어 치환 및 비치환된 4-아미노부티르산 아마이드 (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2:223); 적절하게 치환된 바이시클로[2.2.1] 및 바이시클로[2.2.2] 고리계 (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94:5815); 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드 (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55:5867)를 사용할 수 있다. 글리신의 α-위치에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27:1447)도 또한 ADC에서 유용한 자가 희생적 스페이서의 예이다.

[0571]

한 실시태양에서, 스페이서 단위는 아래에 제시된 분지된 비스(히드록시메틸)스티렌 (BHMS) 단위이고, 이것은 다수의 약물을 도입하고 방출시키는데 사용될 수 있다:



[0572]

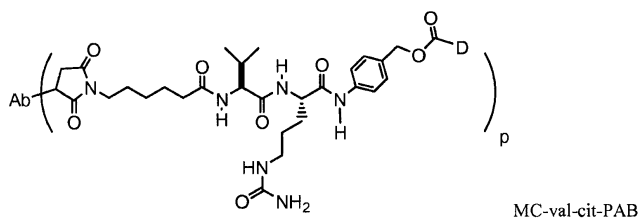
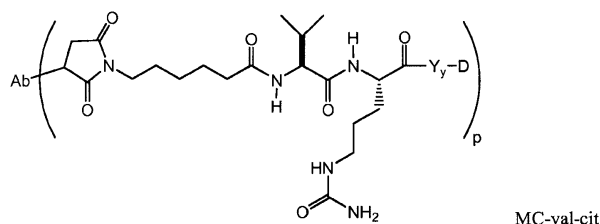
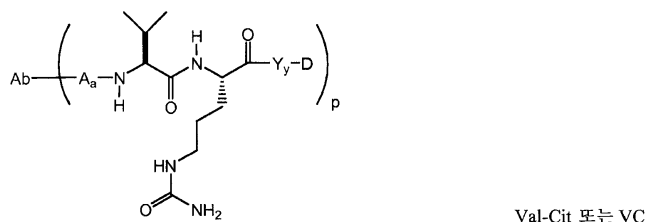
[0573]

여기서, Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이고, n은 0 또는 1이고; p는 1 내지 약 20이다.

[0574]

다른 실시태양에서, 링커 L은 다른 실시태양에서, 링커는 하나 초과와 약물 모이어티를 분지화 다관능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 ([Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관계가 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로딩을 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 단지 하나의 반응성 시스테인 티올기를 보유하는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통하여 부착시킬 수 있다.

[0575] 예시적인 링커 성분 및 그의 조합물은 화학식 II의 ADC와 관련하여 아래에 제시된다:



[0577]

[0578] 스트레처, 스페이서, 및 아미노산 단위를 포함하는 링커 성분은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 US 2005-0238649 A1에 기재된 방법에 의해 합성할 수 있다.

[0579] b. 예시적인 약물 모이어티

[0580] (1) 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0581] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 항체를 포함한다. 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 3896111). 뒤이어, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0582] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 또는 발효 생성물의 유도체화에 의해 제조하기 위해 비교적 이용가능하고, (ii) 디설피드 및 비-디설피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체-약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다.

[0583] 메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기 적합한 메이탄신 화합물은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법에 따라 천연 공급원으로부터 단리하거나 유전 공학 및 발효 기술을 사용하여 생산할 수 있다 (US 6790952; US 2005/0170475; [Yu et al., (2002) PNAS 99:7968-7973]). 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체는 또한 공지된 방법에 따라 합성 방식으로 제조할 수 있다.

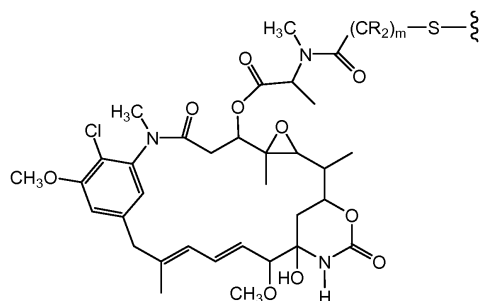
[0584] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 변형된 방향족 고리를 갖는 것, 예를 들어 C-19-테클로로 (미국 특허 4256746) (안사미토신 P2의 수소화알루미늄리튬 환원에 의해 제조됨); C-20-히드록시 (또는 C-20-데메틸) +/- C-19-테클로로 (미국 특허 4361650 및 4307016) (스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 또는 악티노마이세스 (*Actinomyces*)를 사용한 탈메틸화, 또는 LAH를 사용한 탈염소화에 의해 제조됨); 및 C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/- 테클로로 (미국 특허 4,294,757) (아실 클로라이드를 사용한 아실화에 의해 제조됨), 및 다

른 위치에 변형을 갖는 것을 포함한다.

[0585] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 또한 C-9-SH (미국 특허 4424219) (메이탄시놀과 H_2S 또는 P_2S_5 의 반응에 의해 제조됨); C-14-알콕시메틸(테메톡시/ CH_2OR) (US 4331598); C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH_2OH 또는 CH_2OAc) (미국 특허 4450254) (노카르디아 (*Nocardia*)로부터 제조됨); C-15-히드록시/아실옥시 (US 4364866) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조됨); C-15-메톡시 (미국 특허 4313946 및 4315929) (트레위아 누들플로라 (*Trewia nudiflora*)로부터 단리됨); C-18-N-테메틸 (미국 특허 4362663 및 4322348) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조됨); 및 4,5-테옥시 (US 4371533) (메이탄시놀의 삼염화티탄/LAH 환원에 의해 제조됨)와 같은 변형을 갖는 것을 포함한다.

[0586] 메이탄신 화합물 상의 많은 위치가 연결 유형에 따라 연결기 위치로서 유용한 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 에스테르 연결기를 형성하기 위해, 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치가 모두 적합하다 (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

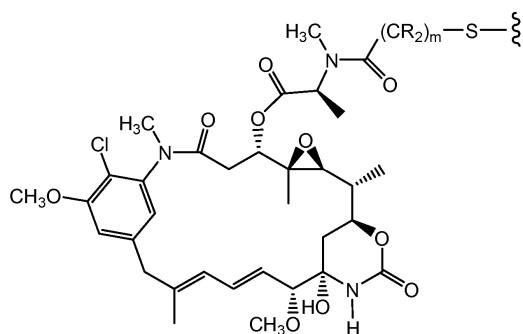
[0587] 메이탄시노이드 약물 모이어티는 다음 구조를 포함한다:



[0588]

[0589] 여기서, 물결선은 ADC의 링커에 대한 메이탄시노이드 약물 모이어티의 황 원자의 공유결합에 의한 부착 나타낸다. R은 독립적으로 H 또는 C_1-C_6 알킬일 수 있다. 아미드기를 황 원자에 부착시키는 알킬렌 사슬은 메타닐, 에타닐, 또는 프로필일 수 있고, 즉, m은 1, 2, 또는 3이다 (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]).

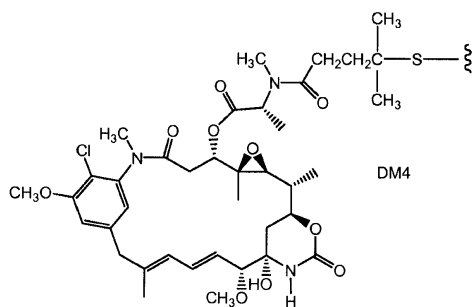
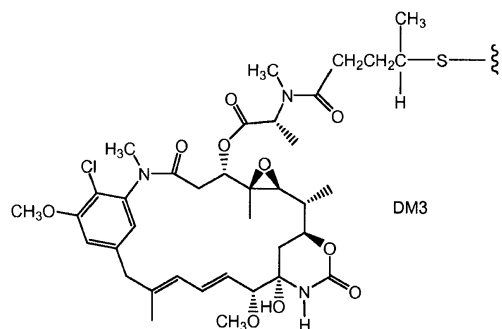
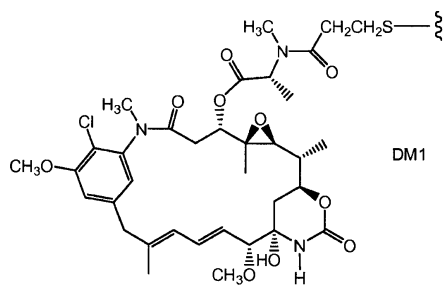
[0590] 메이탄시노이드 약물 모이어티의 모든 입체 이성질체, 즉, D의 키랄 탄소에서 R 및 S 입체형태의 임의의 조합이 본 발명의 화합물에 고려된다. 한 실시태양에서, 메이탄시노이드 약물 모이어티는 다음 입체화학 구조를 가질 것이다:



[0591]

[0592]

메이탄시노이드 약물 모이어티의 예시적인 실시태양은 다음 구조를 갖는 DM1; DM3; 및 DM4를 포함한다:



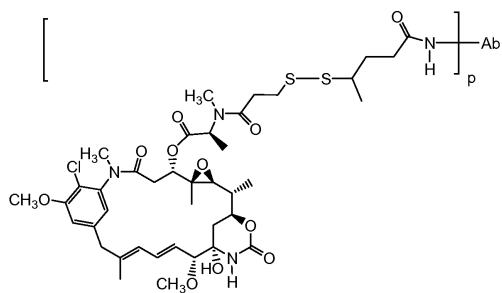
[0593]

[0594]

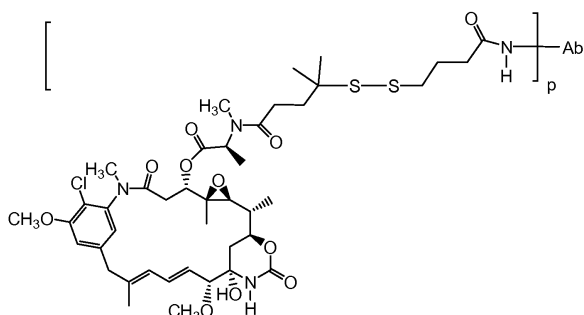
여기서, 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 약물의 황 원자의 공유결합에 의한 부착 나타낸다 (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A1).

[0595]

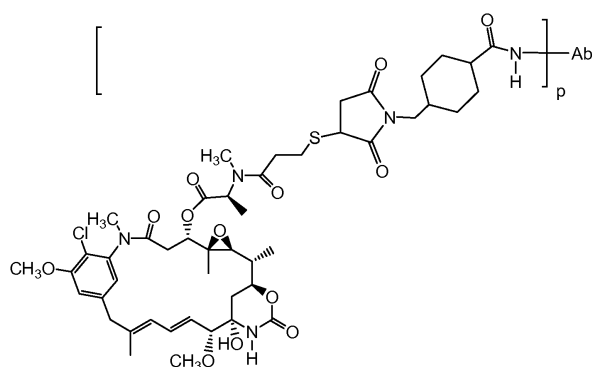
다른 예시적인 메이탄시노이드 항체-약물 접합체는 다음 구조 및 약어를 갖는다 (여기서 Ab는 항체이고, p는 1 내지 약 8임):



Ab-SPP-DM1



Ab-SPDB-DM4

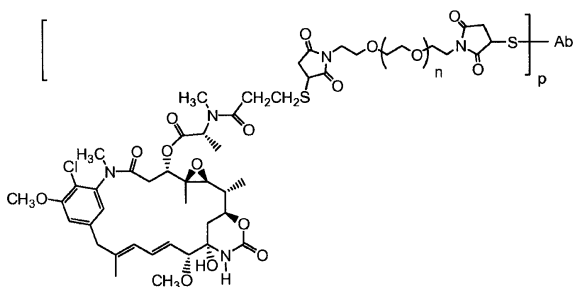


Ab-SMCC-DM1

[0596]

[0597]

DM1이 BMPEO 링커를 통해 항체의 티올기에 연결된 예시적인 항체-약물 접합체는 다음 구조 및 약어를 갖는다:



[0598]

[0599]

여기서, Ab는 항체이고; n은 0, 1 또는 2이고; p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0600]

메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 이들의 치료 용도는 예를 들어, 그 개시내용이 본원에 참고로 명백하게 포함되는 문헌 [Erickson, et al. (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433]; 미국 특허 5,208,020, 5,416,064, US 2005/0276812 A1 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다.

[0601]

항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다 (예를 들어, 그 개시 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함되는 미국 특허 5,208,020 참조). 메이탄시노이드는 공지된 기술에 의해 합성하거나 천연 공급원으로부터 분리할 수 있다.

적합한 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예를 들어 다양한 메이탄시놀 에스테르가 예를 들어 미국 특허 5,208,020, 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다.

[0602] 예를 들어 그 개시 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함되는 미국 특허 5208020 또는 유럽 특허 0 425 235 B1; 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 및 US 2005/016993 A1에 개시된 것을 포함한, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한, 많은 연결기가 당업계에 공지되어 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 US 2005/0276812 A1 ("Antibody Drug Conjugates and Methods")에 개시된 바와 같이 제조할 수 있다. 링커는 상기 확인된 특허에 개시된 바와 같은 디설피드기, 티오에테르기, 산불안정기, 광불안정기, 펩티다제 불안정기, 또는 에스테라제 불안정기를 포함한다. 추가의 링커를 본원에 기재하고 예시한다.

[0603] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 특정 실시태양에서, 디설피드 연결기를 제공하기 위해 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) 또는 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP)이다.

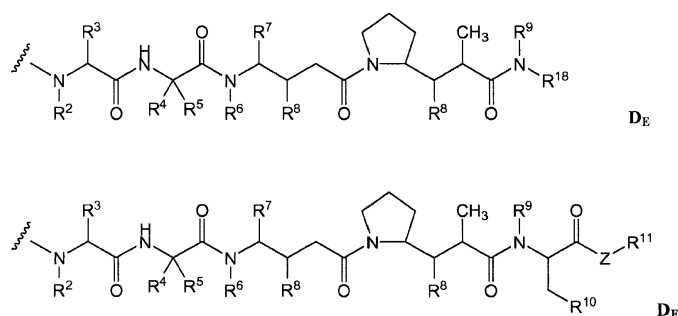
[0604] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결기는 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응시킴으로써 형성할 수 있다. 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 한 실시태양에서, 연결기는 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0605] **(2) 아우리스타틴 및 돌라스타틴**

[0606] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩티드성 유사체 및 유도체, 예를 들어 아우리스타틴 (미국 특허 5635483; 5780588)에 접합된 항체를 포함한다. 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 [Woyke et al., (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584], 항암 (미국 특허 5663149) 및 항진균 활성 [Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965]을 갖는 것으로 나타났다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0607] 예시적인 아우리스타틴 실시태양은 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 D_E 및 D_F (US 2005/0238649, 그 개시내용의 전문을 명백하게 본원에 참고로 포함시킨 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623] (2004년 3월 28일 발행)에 개시됨) 포함한다.

[0608] 펩티드성 약물 모이어티는 하기 화학식 D_E 및 D_F 중에서 선택될 수 있다:



[0609]

[0610] 여기서, D_E 및 D_F의 물결선은 독립적으로 각각의 위치에서 항체 또는 항체-링커 성분에 대한 공유결합에 의한 부

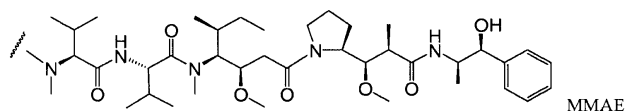
착 부위를 나타내고;

- [0611] R^2 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0612] R^3 은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬- (C_3-C_8) 카르보사이클, C_3-C_8 헤테로 사이클 및 C_1-C_8 알킬- (C_3-C_8) 헤테로사이클)로부터 선택되고;
- [0613] R^4 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬- (C_3-C_8) 카르보사이클, C_3-C_8 헤테로 사이클 및 C_1-C_8 알킬- (C_3-C_8) 헤테로사이클)로부터 선택되고;
- [0614] R^5 는 H 및 메틸로부터 선택되거나;
- [0615] 또는 R^4 및 R^5 는 함께 화학식 $-(CR^aR^b)_n-$ 의 카르보시클릭 고리를 형성하고, 여기서 R^a 및 R^b 는 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬 및 C_3-C_8 카르보사이클로부터 선택되고, n은 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택되고;
- [0616] R^6 은 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0617] R^7 은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬- (C_3-C_8) 카르보사이클, C_3-C_8 헤테로 사이클 및 C_1-C_8 알킬- (C_3-C_8) 헤테로사이클)로부터 선택되고;
- [0618] 각각의 R^8 은 독립적으로 H, OH, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클 및 $O-(C_1-C_8)$ 알킬)로부터 선택되고;
- [0619] R^9 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0620] R^{10} 은 아릴 또는 C_3-C_8 헤테로사이클로부터 선택되고;
- [0621] Z는 O, S, NH, 또는 NR^{12} 이고, 여기서 R^{12} 는 C_1-C_8 알킬이고;
- [0622] R^{11} 은 H, C_1-C_{20} 알킬, 아릴, C_3-C_8 헤테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 로부터 선택되고;
- [0623] m은 1-1000의 정수이고;
- [0624] R^{13} 은 C_2-C_8 알킬이고;
- [0625] R^{14} 는 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;
- [0626] 각각의 R^{15} 는 독립적으로 H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, 또는 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ 알킬이고;
- [0627] 각각의 R^{16} 은 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬, 또는 $-(CH_2)_n-COOH$ 이고;
- [0628] R^{18} 은 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -아릴, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8)$ 헤테로사이클, 및 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8)$ 카르보사이클)로부터 선택되고;
- [0629] n은 0 내지 6의 정수이다.
- [0630] 한 실시태양에서, R^3 , R^4 및 R^7 은 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고, R^5 는 -H 또는 메틸이다. 예시적인 실시태양에서, R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고, R^5 는 -H이고, R^7 은 sec-부틸이다.
- [0631] 또다른 실시태양에서, R^2 및 R^6 은 각각 메틸이고, R^9 는 -H이다.

- [0632] 또다른 실시태양에서, 각각의 R^8 은 $-OCH_3$ 이다.
- [0633] 예시적인 실시태양에서, R^3 및 R^4 은 각각 이소프로필이고, R^2 및 R^6 은 각각 메틸이고, R^5 는 $-H$ 이고, R^7 은 sec -부틸이고, 각각의 R^8 은 $-OCH_3$ 이고, R^9 는 $-H$ 이다.
- [0634] 한 실시태양에서, Z 는 $-O-$ 또는 $-NH-$ 이다.
- [0635] 한 실시태양에서, R^{10} 은 아릴이다.
- [0636] 예시적인 실시태양에서, R^{10} 은 $-페닐$ 이다.
- [0637] 예시적인 실시태양에서, Z 가 $-O-$ 일 때, R^{11} 은 $-H$, 메틸 또는 t -부틸이다.
- [0638] 한 실시태양에서, Z 가 $-NH$ 일 때, R^{11} 은 $-CH(R^{15})_2$ 이고, 여기서 R^{15} 는 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 이고, R^{16} 은 $-C_1-C_8$ 알킬 또는 $-(CH_2)_n-COOH$ 이다.

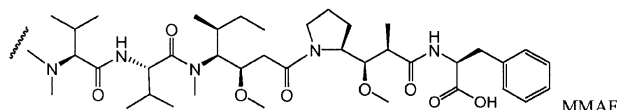
[0639] 다른 실시태양에서, Z 가 $-NH$ 일 때, R^{11} 은 $-CH(R^{15})_2$ 이고, 여기서 R^{15} 는 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 이다.

[0640] 화학식 D_E의 예시적인 아우리스타틴 실시태양은 MMAE이고, 여기서 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유결합에 의한 부착 나타낸다:



[0641]

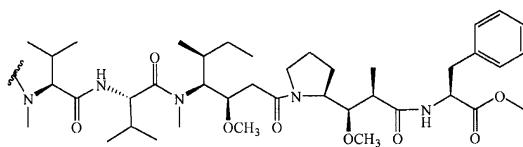
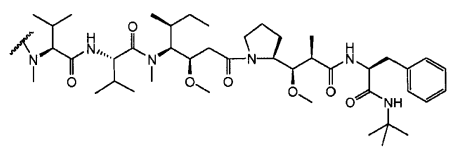
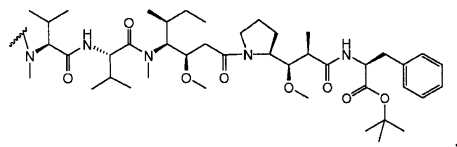
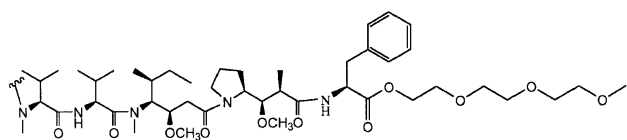
[0642] 화학식 D_F의 예시적인 아우리스타틴 실시태양은 MMAF이고, 여기서 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유결합에 의한 부착 나타낸다 (US 2005/0238649 및 문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124] 참조):



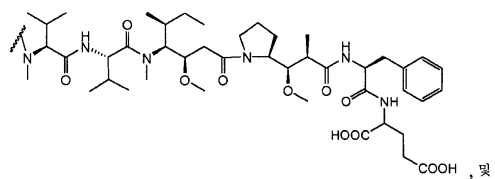
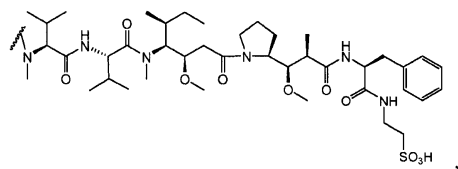
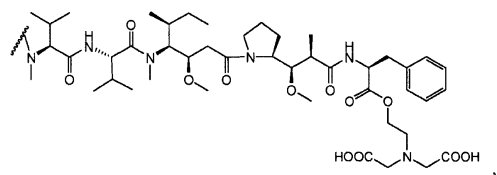
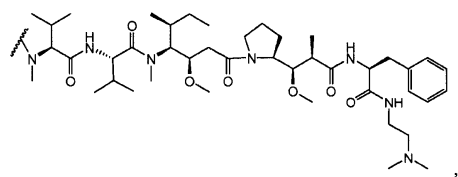
[0643]

[0644] 다른 예시적인 실시태양은 펜타펩티드 아우리스타틴 약물 모이어티의 C-말단에서 페닐알라닌 카르복시 변형을 갖는 모노메틸발린 화합물 (WO 2007/008848), 및 펜타펩티드 아우리스타틴 약물 모이어티의 C-말단에서 페닐알라닌 측쇄 변형을 갖는 모노메틸발린 화합물을 포함한다 (WO 2007/008603).

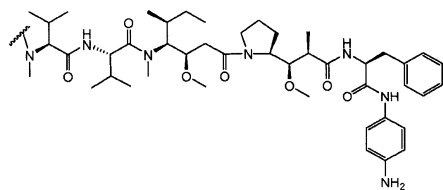
[0645] 다른 약물 모이어티는 다음 MMAF 유도체들을 포함하고, 여기서 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유결합에 의한 부착 나타낸다:



[0646]



[0647]



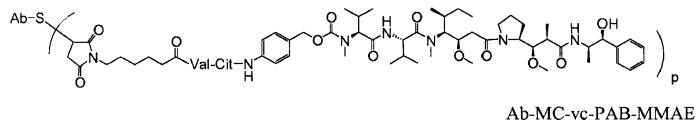
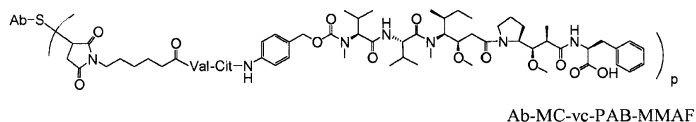
[0648]

[0649]

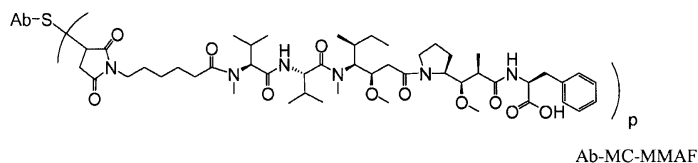
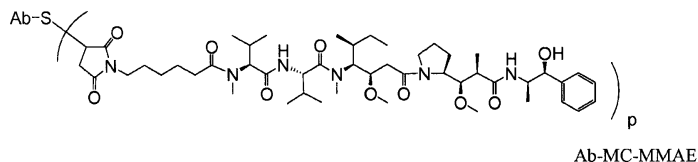
한 측면에서, 상기 제시한 바와 같은 트리에틸렌 글리콜 에스테르 (TEG)를 포함하고 이에 제한되지 않는 친수성기가 R^{11} 에서 약물 모이어티에 부착될 수 있다. 임의의 특정 이론에 매이지 않지만, 친수성기는 약물 모이어티의 내재화 및 응집 방식을 돕는다.

[0650]

아우리스타틴/돌라스타틴 또는 그의 유도체를 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시적인 실시태양은 본원에 참고로 명백하게 포함되는 US 2005-0238649 및 문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124]에 기재되어 있다. MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시적인 실시태양은 다음 구조 및 약어를 갖는다 (여기서, "Ab"는 항체이고; p는 1 내지 약 8이고, "Val-Cit" 또는 "vc"는 발린-시트룰린 디펩티드이고; "S"는 황 원자이다). 본원에서 황 연결된 ADC의 구조적 설명의 몇몇에서, 항체는 단지 황 연결 양상을 나타내도록 "Ab-S"로서 표시됨을 알 것이고, 특정 황 원자는 다수의 링커-약물 모이어티를 보유하는 것을 나타내지 않는다. 다음 구조의 좌측 괄호는 또한 Ab와 S 사이의 황 원자의 좌측에 놓일 수 있고, 이는 본원 전체에서 설명된 본 발명의 ADC의 동등한 설명일 것이다.



[0651]



[0652]

[0653]

MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시적인 실시태양은 Ab-MC-PAB-MMAF 및 Ab-PAB-MMAF를 추가로 포함한다. 흥미롭게도, 단백질 분해에 의해 절단가능하지 않은 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체는 단백질 분해에 의해 절단가능한 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체에 대응하는 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124] 참조). 상기한 경우에, 약물 방출은 세포 내에서 항체 분해에 의해 이루어지는 것으로 생각된다 (상기 문헌 참조).

[0654]

전형적으로, 펩티드-기반 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 잘 알려져 있는 액체상 합성 방법 (문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조할 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 US 2005-0238649 A1; 미국 특허 5635483; 미국 특허 5780588; 문헌 ([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. 15:859-863] 및 [Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784])의 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0655] 특히, 화학식 D_F의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예를 들어 MMAF 및 그의 유도체는 US 2005-0238649 A1 및 문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 화학식 D_E의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예를 들어 MMAE 및 그의 유도체는 문헌 [Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 약물-링커 모이어티 MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, 및 MC-vc-PAB-MMAE는 예를 들어 문헌 [Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784], 및 미국 특허 출원 공개 US 2005/0238649 A1에 기재된 바와 같은 통상적인 방법으로 편리하게 합성한 후, 관심있는 항체에 접합할 수 있다.

[0656] (3) 칼리케아미신

[0657] 다른 실시태양에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 항체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리 항체는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 제조에 대해서는 미국 특허 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 컴퍼니 (American Cyanamid Company))을 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I 을 포함하고 이로 제한되지 않는다 ([Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)]; 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 다른 항-종양 약물은 항염산제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 모두 세포내 작용 부위를 갖고, 형질막을 쉽게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개된 내재화를 통한 이들 물질의 세포 내 흡수는 그들의 세포독성 효과를 크게 향상시킨다.

[0658] c. 다른 세포독성제

[0659] 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양 물질은 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 물질의 패밀리, 및 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296)을 포함한다.

[0660] 사용할 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 애틀리노사로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르티이 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시달리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다 (예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).

[0661] 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.

[0662] 특정 실시태양에서, 면역접합체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 면역접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc^{99m} 또는 I¹²³을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, MRI로도 공지됨)용 스핀 (spin) 표지, 예를 들어 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 붐소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0663] 방사성 표지 또는 다른 표지를 공지된 방식으로 면역접합체 내에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신에 붐소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용하는 화학적 아미노산 합성에 의해 합성할 수 있다. tc^{99m} 또는 I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ 및 In¹¹¹과 같은 표지가 펩티드 내의 시스템인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 요오도젠 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57])을 사용하여 요오드-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이

상세히 기재되어 있다.

[0664] 특정 실시태양에서, 면역접합체는 전구약물 (예를 들어, 펩티딜 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 약물, 예를 들어 항암 약물로 전환시키는 전구약물-활성화 효소에 접합된 항체를 포함할 수 있다. 그러한 면역접합체는 항체 의존 효소 매개 전구약물 요법 ("ADEPT")에서 유용하다. 항체에 접합될 수 있는 효소는 인산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스포타제; 술페이트 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴술포타제; 무독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아 (serratia) 프로테아제, 테르몰리신, 섭틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텝신 (예를 들어, 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 글리코실화된 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들어 β -갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β -락탐아제; 및 그들의 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸기 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페니실린 아마이드, 예를 들어 페니실린 V 아마이드 또는 페니실린 G 아마이드를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 효소는 당업계에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술에 의해 항체에 공유결합시킬 수 있다 (예를 들어, [Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)] 참조).

[0665] **d. 약물 로딩**

[0666] 약물 로딩은 화학식 I의 분자에서 항체당 약물 모이어티의 평균 수인 p로 표시된다. 약물 로딩은 항체당 1 내지 20개의 약물 모이어티 (D)일 수 있다. 화학식 I의 ADC는 1 내지 20개의 약물 모이어티와 접합된 항체의 집합체를 포함한다. 접합 반응에 의한 ADC의 제조에서 항체당 약물 모이어티의 평균 수는 통상적인 수단, 예를 들어 질량 분광분석, ELISA 분석, 및 HPLC에 의해 특성 결정할 수 있다. 또한, p의 측면에서 ADC의 정량적 분포를 결정할 수 있다. 일부 경우에, p가 다른 약물 로딩을 갖는 ADC로부터의 특정 값인 균질 ADC의 분리, 정제 및 특성 결정은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성할 수 있다. 따라서, 화학식 I의 항체-약물 접합체의 제약 제제는 그러한 접합체의 1, 2, 3, 4개 이상의 약물 모이어티에 연결된 항체와의 불균질 혼합물일 수 있다.

[0667] 일부 항체-약물 접합체에 대해, p는 항체 상의 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 상기 예시적인 실시태양에서와 같이 부착이 시스테인 티올인 경우에, 항체는 단지 하나 또는 수개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 또는 링커가 부착할 수 있는, 충분히 반응성인 티올기를 단지 하나 또는 여러 개 가질 수 있다. 특정 실시태양에서, 보다 큰 약물 로딩, 예를 들어 $p > 5$ 는 특정 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성, 또는 세포 투과성 상실을 일으킬 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 ADC에 대한 약물 로딩은 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6; 또는 약 3 내지 약 5이다. 실제로, 특정 ADC에 대해, 항체당 약물 모이어티의 최적비는 8 미만일 수 있고, 약 2 내지 약 5일 수 있음이 밝혀졌다. US 2005-0238649 A1을 참조한다.

[0668] 특정 실시태양에서, 이론적 최대치 미만의 약물 모이어티가 접합 반응 동안 항체에 접합된다. 항체는 예를 들어, 아래에 논의된 바와 같이 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하지 않는 리신 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 항체는 약물 모이어티에 연결될 수 있는 많은 유리 및 반응성 시스테인 티올기를 함유하지 않고; 실제로 항체 내의 대부분의 시스테인 티올 잔기는 디설피드 다리로서 존재한다. 특정 실시태양에서, 항체를 부분 또는 완전 환원 조건 하에 환원제, 예를 들어 디티오프로트레이톨 (DTT) 또는 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP)으로 환원시켜 반응성 시스테인 티올기를 생성할 수 있다. 특정 실시태양에서, 항체는 변성 조건에 적용되어 반응성 친핵기, 예를 들어 리신 또는 시스테인을 드러내게 된다.

[0669] ADC의 로딩 (약물/항체 비)은 상이한 방식, 예를 들어 (i) 항체에 비해 몰 과량의 약물-링커 중간체 또는 링커 시약의 제한, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도의 제한, 및 (iii) 시스테인 티올 변형에 대한 부분 또는 제한 환원 조건에 의해 제어할 수 있다.

[0670] 하나 초과와 친핵기가 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과, 이어서 약물 모이어티 시약과 반응하면, 생성되는 생성물은 항체에 부착된 하나 이상의 약물 모이어티의 분포를 갖는 ADC 화합물들의 혼합물임을 이해하여야 한다. 항체당 약물의 평균 수는 항체에 특이적이고 약물에 특이적인 이중 ELISA 항체 검정에 의해 혼합물로부터 계산할 수 있다. 개별 ADC 분자는 질량 분광분석에 의해 혼합물 내에서 확인하고, HPLC, 예를 들어 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 분리할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [McDonagh et al. (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307]; Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070]; [Hamblett, K. J., 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 Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004] 참조). 특정 실시태양에서, 단일 로딩 값을 갖는 균질 ADC는 전기영동 또는 크로마토 그래피에 의해 접합 혼합물로부터 분리할 수 있다.

[0671]

e. 면역접합체의 특정 제조 방법

[0672]

화학식 I의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 사용하는 몇몇 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵기를 이가 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵기를 이가 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 D-L을 형성시킨 후, 이를 항체의 친핵기와 반응시키는 방법. 두 번째 경로를 통해 화학식 I의 ADC를 제조하는 예시적인 방법은 본원에 참고로 명백하게 포함되는 US 2005-0238649 A1에 기재되어 있다.

[0673]

항체 상의 친핵기는 (i) N-말단 아민기; (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신; (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인; 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (여기서, 항체는 글리코실화된다)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 사슬간 디설피드, 즉 시스테인 다리를 갖는다. 항체는 항체가 완전히 또는 부분적으로 환원되도록 환원제, 예를 들어 DTT (디티오프레틸톨) 또는 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP)로 처리함으로써 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 다리는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 추가의 친핵기를 리신 잔기의 변형을 통해, 예를 들어 리신 잔기와 2-이미노티올란 (트라우트 (Traut) 시약)을 반응시켜 아민을 티올로 전환시켜 항체 내로 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4개 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체 내로 도입할 수 있다.

[0674]

본 발명의 항체-약물 접합체는 또한 항체 상의 친전자기, 예를 들어 알데히드 또는 케톤 카르보닐기와 링커 시약 또는 약물 상의 친핵기 사이의 반응에 의해 생성할 수 있다. 링커 시약 상의 유용한 친핵기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 한 실시태양에서, 항체를 변형시켜 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입한다. 다른 실시태양에서, 글리코실화된 항체의 당은 예를 들어 피요오데이트 산화 시약으로 산화시켜, 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 슈프 (Schiff) 염기 기는 안정한 연결기를 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소화 붕소 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결기를 형성할 수 있다. 한 실시태양에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-피요오데이트와 반응시키면, 약물 상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 항체 내에 생성될 수 있다 (Hermanson, Bioconjugate Techniques). 다른 실시태양에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 항체를 나트륨 메타-피요오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드를 생성할 수 있다 ([Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; US 5362852). 그러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0675]

약물 모이어티 상의 친핵기는, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0676]

본 발명의 화합물은 상업적으로 이용가능한 다음 시판 가교결합제 시약 (예를 들어 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (미국 일리노이주 록포드)로부터; [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 페이지 467-498 참조)을 사용하여 제조된 ADC를 명백히 고려하고 이로 제한되지 않는다: BMPs, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트).

[0677]

항체 및 세포독성제를 포함하는 접합체는 또한 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-

페리딜티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오타이드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이팅제이다. W094/11026을 참조한다.

[0678] 별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 재조합 DNA 분자는 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리되거나 서로 인접해 있는 접합체의 항체 및 세포독성 부분을 코딩하는 영역을 포함할 수 있다.

[0679] 또다른 실시태양에서, 항체를 중앙 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (예를 들어, 스트렙타비딘)에 접합할 수 있고, 여기서 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소실제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거한 후, 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0680] 예시적인 면역접합체 - Thio-항체 약물 접합체

[0681] **a. 시스테인 조작된 항-CD79b 항체의 제조**

[0682] 본 발명의 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 및 모 항-CD79b 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 DNA는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 부위-지정 (또는 올리고뉴클레오타이드-매개된) 돌연변이 유발에 의한 제조 ([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]), PCR 돌연변이 유발 ([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]; 및 [Vallette et al. (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733]), 및 폴리펩티드를 코딩하는 미리 제조된 DNA의 카세트 돌연변이 유발 (Wells et al. (1985) Gene 34:315-323)을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 방법에 의해 제조한다. 돌연변이 유발 프로토콜, 키트, 및 시약은 상업적으로 이용가능하고, 예를 들어 QuikChange® 다중 부위 지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타젠 (Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 줄라)이 존재한다. 단일 돌연변이는 또한 PCR 기반 돌연변이 유발에 의해 주형으로서 이중 가닥 플라스미드 DNA를 사용하는 올리고뉴클레오타이드 유도 돌연변이 유발에 의해서 생성된다 ([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]). 재조합 항체의 변이체는 제한 단편 조작에 의해 또는 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용한 중첩 연장 (overlap extension) PCR에 의해서도 또한 제조할 수 있다. 돌연변이 유발 프라이머는 시스테인 코돈 치환(들)을 코딩한다. 표준 돌연변이 유발 기술을 사용하여 그러한 돌연변이체 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA를 생성할 수 있다 ([Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]; 및 [Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N. Y., 1993]).

[0683] 파지 디스플레이 기술 (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553)을 사용하여, 항-CD79b 인간 항체 및 항체 단편을 비면역화된 공여체로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리오로부터 시험관 내에서 생산할 수 있다. 상기 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트형 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 주 또는 부 코트 단백질 유전자 내로 인-프레임으로 클로닝되고, 파지 입자의 표면 상에 기능성 항체 단편으로서 디스플레이된다. 필라멘트형 입자는 파지 계능의 단일 가닥 DNA 카피를 포함하므로, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 또한 이들 특성을 보이는 항체를 코딩하는 유전자를 선택하는 것이다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성의 일부를 모방한다 ([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).

[0684] 항-CD79b 항체는 공지의 올리고펩티드 합성 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있거나, 재조합 기술을 사용

하여 제조하고 정제할 수 있다. 적절한 아미노산 서열, 또는 그의 일부는 고체상 기술을 사용하여 직접 펩티드 합성에 의해 생산할 수 있다 ([Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA]; [Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154]). 시험관내 단백질 합성은 수동 기술을 사용하여 또는 자동화에 의해 수행할 수 있다. 자동화 고체상 합성은 예를 들어 t-BOC 또는 Fmoc 보호된 아미노산을 사용하고 어플라이드 바이오시스템즈 펩티드 합성기 (미국 캘리포니아주 포스터 시티)를 제조사의 지시에 따라 이용하여 달성할 수 있다. 항-CD79b 항체 또는 CD79b 폴리펩티드의 다양한 부분들은 따로 화학적으로 합성하고, 목적하는 항-CD79b 항체 또는 CD79b 폴리펩티드를 생산하기 위해 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합할 수 있다.

[0685] 항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백 분해 소화를 통해 유도되거나 ([Morimoto et al. (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117]; 및 [Brennan et al. (1985) Science, 229:81]), 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산되었다. Fab, Fv 및 ScFv 항-CD79b 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되고 이로부터 분리되어 다량의 이들 단편을 쉽게 생산할 수 있다. 항체 단편은 본원에서 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 분리할 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있거나 (Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:163-167), 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 분리할 수 있다. 항-CD79b 항체는 (scFv) 단일체 Fv 단편일 수 있다 (WO 93/16185; US 5571894; US 5587458). 항-CD79b 항체 단편은 또한 "선형 항체"일 수 있다 (US 5641870). 그러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중 특이적일 수 있다.

[0686] 아래의 설명은 주로 항-CD79b-코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 세포를 배양함으로써 항-CD79b 항체를 생산하는 것에 관한 것이다. 항-CD79b 항체를 코딩하는 DNA는 항-CD79b 항체 mRNA를 보유하고 이를 검출가능한 수준으로 발현하는 것으로 생각되는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 따라서, 인간 항-CD79b 항체 또는 CD79b 폴리펩티드 DNA는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 얻을 수 있다. 항-CD79b 항체-코딩 유전자는 또한 계놈 라이브러리로부터 얻을 수 있거나 공지의 합성 과정 (예를 들어, 자동 핵산 합성)에 의해 얻을 수 있다.

[0687]본 발명의 설계, 선택 및 제조 방법에 의해 친전자성 관능기와 반응성인 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 얻을 수 있다. 이들 방법에 의해 지정되고 설계된 선택적인 부위에서 약물 분자를 갖는 항체 접합체 화합물, 항체-약물 접합체 (ADC) 화합물을 추가로 얻을 수 있다. 항체 표면 상의 반응성 시스테인 잔기는 티올 반응기, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통한 약물 모이어티의 특이적 접합을 허용한다. 말레이미드기에 대한 Cys 잔기의 티올 관능기의 친핵 반응성은 단백질 내의 임의의 다른 아미노산 관능기, 예를 들어 리신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비해 약 1000배 더 크다. 요오도아세틸 및 말레이미드 시약 내의 티올 특이적 관능기는 아민기와 반응할 수 있지만, 보다 높은 pH (>9.0) 및 보다 긴 반응 시간이 요구된다 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). 단백질 내의 유리 티올의 양은 표준 엘만 (Ellman) 분석에 의해 추정할 수 있다. 면역글로불린 M은 디설피드-연결된 펜타머의 예인 한편, 면역글로불린 G는 함께 서브유닛을 결합시키는 내부 디설피드 다리를 갖는 단백질의 예이다. 이와 같은 단백질에서, 반응성 유리 티올을 생성하기 위해 디티오프레이톨 (DTT) 또는 셀레놀과 같은 시약 (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304: 147-156)을 사용하여 디설피드 결합을 환원하는 것이 요구된다. 상기 방법은 항체 3차 구조 및 항원 결합 특이성을 상실시킬 수 있다.

[0688]PHESELECTOR (반응성 티올의 선택을 위한 파지 ELISA) 분석을 통해 ELISA 파지 포맷으로 항체 내의 반응성 시스테인기를 검출하고, 이에 의해 시스테인 조작된 항체의 설계를 도울 수 있다 ([Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol. Methods 332:41-52]; WO 2006/034488; US 2007/0092940). 시스테인 조작된 항체를 웰 표면에 코팅한 후, 파지 입자와 함께 인큐베이션하고, HRP 표지된 2차 항체를 첨가하고, 흡광도를 검출한다. 파지 상에 디스플레이된 돌연변이체 단백질은 신속하고 강력하고 고효율 방식으로 스크리닝할 수 있다. 시스테인 조작된 항체의 라이브러리를 제조하고, 항체 또는 다른 단백질의 무작위 단백질-파지 라이브러리로부터 유리 Cys 통합을 위한 적절하게 반응성인 부위를 확인하기 위한 것과 동일한 방법을 사용하여 결합에 대해 선택할 수 있다. 상기 기술은 파지 상에 디스플레이된 시스테인 돌연변이체 단백질을 또한 티올-반응성인 친화도 시약 또는 리포터기와 반응시키는 것을 포함한다.

[0689]PHESELECTOR 분석은 항체 내의 반응성 티올기의 스크리닝을 허용한다. 이 방법에 의한 A121C 변이체의 확인은 예시적인 것이다. 전체 Fab 분자는 반응성 티올기를 갖는 보다 많은 ThioFab 변이체를 확인하기 위해 효과적으로 검색될 수 있다. 분획별 표면 접근성 (fractional surface accessibility) 파라미터를 사용하여 폴리펩티

드 내의 아미노산 잔기에 대한 용매의 접근성을 확인하고 정량하였다. 표면 접근성은 용매 분자, 예를 들어 물이 접촉할 수 있는 표면적 ($\text{\AA}^2$)으로 표현할 수 있다. 물의 점유 공간은 1.4 $\text{\AA}$ 반경 구체와 비슷하다. 소프트웨어는 공지의 x-선 결정학 유도 좌표를 사용하여 단백질의 각각의 아미노산의 표면 접근성을 계산하기 위한 알고리즘을 이용하는 결정학 프로그램의 CCP4 Suite ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763)로서 무료로 이용가능하거나 허가를 받아 사용할 수 있다 (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, 또는 인터넷 www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html). 표면 접근성 계산을 수행하는 2개의 예시적인 소프트웨어 모듈은 문헌 [B. Lee and F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400]의 알고리즘을 기초로 한 "AREAIMOL" 및 "SURFACE"이다. ARAIMOL은 단백질의 용매 접근가능한 표면을 프로브 구 (용매 분자를 나타냄)의 중심의 궤적으로서 정의하는데, 이것이 단백질의 판 데르 발스 (Van der Waals) 표면 위로 굴러다니기 때문이다. ARAIMOL은 (원자 반경과 프로브 반경의 합과 동일한, 원자 중심으로부터의 거리에서) 각각의 원자 주위의 연장된 구 상에 표면 지점을 생성하고 이웃하는 원자들과 회합된 동등한 구 내에 놓인 것을 제거하여 용매 접근가능한 표면적을 계산한다. ARAIMOL은 PDB 좌표 파일에서 원자의 용매 접근가능한 면적을 찾아내고, 잔기에 의해, 사슬에 의해 및 전체 분자에 대해 접근가능한 면적을 요약한다. 개별 원자에 대한 접근가능한 면적 (또는 면적 차이)은 슈도-PDB (pseudo-PDB) 출력 파일에 기록될 수 있다. ARAIMOL은 각각의 원소에 대해 단일 반경을 추정하고, 오직 제한된 수의 상이한 원소들만을 인식한다.

[0690]

AREAIMOL 및 SURFACE는 절대적 접근성, 즉 제곱 옹스트롬($\text{\AA}^2$)의 수를 보고한다. 분획별 표면 접근성은 폴리펩티드 내의 아미노산과 관련된 표준 상태를 참조하여 계산된다. 참조 상태는 트리펩티드 Gly-X-Gly이고, 여기서 X는 관심있는 아미노산이고, 참조 상태는 '연장된' 입체형태, 즉, 베타-가닥으로 존재하는 것과 같아야 한다. 연장된 입체형태는 X의 접근성을 최대화한다. 접근가능한 면적의 계산치를 Gly-X-Gly 트리펩티드 참조 상태 내의 접근가능한 면적으로 나누고 그 몫을 보고하는데, 이것이 분획별 접근성이다. 접근성 (%)은 분획별 접근성 $\times 100$ 의 값이다. 표면 접근성 계산을 위한 또다른 예시적 알고리즘은, 물 구체에 대한 아미노산 잔기의 분획별 접근성을 폴리펩티드의 X선 좌표에 기초하여 계산하는 프로그램 xsae의 SOLV 모듈에 기초한다 [Broger, C.F. Hoffman-LaRoche, Basel]. 항체 내의 모든 아미노산에 대한 분획별 표면 접근성은 이용가능한 결정 구조 정보 [Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995]를 이용하여 계산할 수 있다.

[0691]

시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 쉽게 분리하고 서열 결정된다. 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 공급원 역할을 한다. 일단 분리된 후, DNA를 발현 벡터 내로 도입할 수 있고, 이어서 이를 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 그렇지 않으면 항체 단백질을 생산하지 않는 다른 포유동물 숙주 세포, 예를 들어 골수종 세포 (US 5807715, US 2005/0048572, US2004/0229310) 등으로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포 내에서 모노클로날 항체를 합성한다.

[0692]

설계 및 선택 후에, 조작되고 고도로 반응성이고 쌍을 이루지 않은 Cys 잔기, "유리 시스테인 아미노산"을 갖는 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 ThioFab는, (i) 박테리아, 예를 들어 이. 콜라이 시스템 ([Skerra et al. (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262]; [Plueckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188]) 또는 포유동물 세포 배양 시스템 (WO 01/00245), 예를 들어 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO)에서의 발현, 및 (ii) 통상의 단백질 정제 기술을 이용한 정제 [Lowman et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988]를 통해 생산할 수 있다.

[0693]

조작된 Cys 티올기는 친전자성 링커 시약 및 약물-링커 중간체와 반응하여, 시스테인 조작된 항체 약물 접합체 및 다른 표지된 시스테인 조작된 항체를 형성한다. 쌍을 이루어 사슬간 및 사슬내 디설피드 결합을 형성하는 모 항체에 존재하는 시스테인 조작된 항체의 Cys 잔기는 임의의 반응성 티올기를 갖지 않고 (환원제로 처리하지 않으면), 친전자성 링커 시약 또는 약물-링커 중간체와 반응하지 않는다. 새로 조작된 Cys 잔기는 쌍을 이루지 않은 채로 유지되어, 친전자성 링커 시약 또는 약물-링커 중간체, 예를 들어 약물-말레이미드와 반응, 즉 접합할 수 있다. 예시적인 약물-링커 중간체는 MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE, 및 MC-vc-PAB-MMAF를 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 조작된 Cys 잔기의 구조적 위치는 순차적 넘버링 시스템에 따라 넘버링한다. 이 순차적 넘버링 시스템은 N-말단에서 출발하는 카바트 넘버링 시스템 [Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD]과 상관관계가 있으며, 이는 a, b, c로 표시한 삽입이 카바트 넘버링 방식 (아래쪽 열)과 다르다. 카바트 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 이 내부

로의 삽입에 대응하는 더 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 시스테인 조작된 중쇄 변이체 부위는 순차적 넘버링 및 카바트 넘버링 방식에 의해 확인된다.

[0694] 한 실시태양에서, 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는

[0695] (a) 모 항-CD79b 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환하고;

[0696] (b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 시약과 반응시켜, 시스테인 조작된 항-CD79b 항체의 티올 반응성을 결정하는 것

[0697] 을 포함하는 방법에 의해 제조된다.

[0698] 시스테인 조작된 항체는 모 항체보다 티올-반응성 시약에 대한 반응성이 더 클 수 있다.

[0699] 유리 시스테인 아미노산 잔기는 중쇄 또는 경쇄에, 또는 불변 또는 가변 도메인에 위치할 수 있다. 항체 단편, 예를 들어 Fab도 항체 단편의 아미노산을 치환하는 하나 이상의 시스테인 아미노산으로 조작되어 시스테인 조작된 항체 단편을 형성할 수 있다.

[0700] 본 발명의 다른 실시태양에서는

[0701] (a) 하나 이상의 시스테인 아미노산을 모 항-CD79b 항체 내로 도입하여 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 생성하고;

[0702] (b) 티올-반응성 시약을 사용하여 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성을 결정하는 것

[0703] 을 포함하고; 여기서, 시스테인 조작된 항체가 모 항체보다 티올-반응성 시약에 대한 반응성이 더 큰 것인, 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 제조하는 (만드는) 방법을 제공한다. 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (a)는

[0704] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열을 돌연변이시키고;

[0705] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키고;

[0706] (iii) 시스테인 조작된 항체를 분리하고 정제하는 것

[0707] 을 포함할 수 있다.

[0708] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는 파지 또는 파지미드 입자로부터 선택되는 바이러스 입자에 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.

[0709] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는 또한

[0710] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성하고;

[0711] (ii) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질 (capture media)에 대한 결합을 측정하는 것

[0712] 을 포함할 수 있다.

[0713] 본 발명의 또다른 실시태양은

[0714] (a) 하나 이상의 시스테인 아미노산을 모 항체 내로 도입하여 시스테인 조작된 항체를 생성하고;

[0715] (b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성하고;

[0716] (c) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질에 대한 결합을 측정하고;

[0717] (d) 티올-반응성 시약을 사용하여 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성을 결정하는 것

[0718] 을 포함하는, 티올 반응성에 대해 고도로 반응성인 쌍을 이루지 않은 시스테인 아미노산을 갖는 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0719] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (a)는

[0720] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열을 돌연변이시키고;

- [0721] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키고;
- [0722] (iii) 시스테인 조작된 항체를 단리하고 정제하는 것
- [0723] 을 포함할 수 있다.
- [0724] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는 파지 또는 파지미드 입자로부터 선택되는 바이러스 입자 상에 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0725] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는 또한
- [0726] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성하고;
- [0727] (ii) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질에 대한 결합을 측정하는 것
- [0728] 을 포함할 수 있다.
- [0729] **b. 항-CD79b IgG 변이체의 시스테인 조작**
- [0730] 시스테인은 본원에 기재된 시스테인 조작 방법에 의해 중쇄 118 (EU 넘버링) (순차적 넘버링의 중쇄 위치 118에 해당) 부위에서 전장 키메라 모 모노클로날 항-CD79b 항체에, 또는 경쇄 205 (카바트 넘버링) (순차적 넘버링의 경쇄 위치 209에 해당) 부위에서 전장 키메라 모 모노클로날 항-CD79b 항체에 도입하였다.
- [0731] 생성된 중쇄 118 (EU 넘버링)에서 시스테인을 갖는 시스테인 조작된 항체는 (a) 중쇄 서열 (서열 228)과 경쇄 서열 (서열 229)를 갖는 thio-MA79b.v17-HC(A118C) (도 24); (b) 중쇄 서열 (서열 230)과 경쇄 서열 (서열 231)을 갖는 thio-MA79b.v18-HC(A118C) (도 25); (c) 중쇄 서열 (서열 232)과 경쇄 서열 (서열 233)을 갖는 thio-MA79b.v28-HC(A118C) (도 26); (d) 중쇄 서열 (서열 236)과 경쇄 서열 (서열 237)을 갖는 thio-MA79b-HC(A118C) (도 28); 및 (e) 중쇄 서열 (서열 244)과 경쇄 서열 (서열 245)을 갖는 thio-항-cynoCD79b-HC(A118C) (도 48)이었다.
- [0732] 생성된 경쇄 205 (카바트 넘버링)에서 시스테인을 갖는 시스테인 조작된 항체는 (a) 중쇄 서열 (서열 234)와 경쇄 서열 (서열 235)을 갖는 thio-MA79b-LC(V205C) (도 27) 및 (b) 중쇄 서열 (서열 299)과 경쇄 서열 (서열 300)을 갖는 thio-항-cynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C) (도 49)이었다.
- [0733] 이들 시스테인 조작된 모노클로날 항체는 1 mM 시스테인을 함유하는 배지 내에서 일시적 발효에 의해 CHO (차이 니즈 햄스터 난소) 세포에서 발현시켰다.
- [0734] 한 실시태양에 따르면, 인간화 MA79b 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 다음 중쇄 서열 (서열 251-259, 표 2) 중 하나 이상을 포함한다.

표 2

인간화 MA79b 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 변이체에 대한 중쇄 순차적, 카바트 및 EU 넘버링의 비교

서열	순차적 넘버링	카바트 넘버링	EU 넘버링	서열
EVQLC <u>ES</u> GGG	V5C	V5C		251
LRLSC <u>C</u> ASGYT	A23C	A23C		252
MNSLR <u>C</u> EDTAV	A88C	A84C		253
TLVTV <u>C</u> SASTK	S116C	S112C		254
VTVSS <u>C</u> STKGP	A118C	A114C	A118C	255
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T120C	T116C	T120C	256
WYVDG <u>C</u> EVHNA	V282C	V278C	V282C	257
KGFYPC <u>D</u> IAVE	S375C	S371C	S375C	258
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S400C	S396C	S400C	259

[0735]

[0736]

한 실시태양에 따르면, 키메라 MA79b 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 다음 중쇄 서열 (서열 260-268, 표 3) 중 하나 이상을 포함한다.

표 3

chMA79b 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 변이체에 대한 중쇄 순차적, 카바트 및 EU 넘버링의 비교:

서열	순차적 넘버링	카바트 넘버링	EU 넘버링	서열
EVQLC <u>Q</u> SGAE	Q5C	Q5C		260
VKISC <u>C</u> ATGYT	K23C	K23C		261
LSSLT <u>C</u> EDSAV	S88C	S84C		262
TSVTV <u>C</u> SASTK	S116C	S112C		263
VTVSS <u>C</u> STKGP	A118C	A114C	A118C	264
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T120C	T116C	T120C	265
WYVDG <u>C</u> EVHNA	V282C	V278C	V282C	266
KGFYPC <u>D</u> IAVE	S375C	S371C	S375C	267
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S400C	S396C	S400C	268

[0737]

[0738]

한 실시태양에 따르면, 항-cynoCD79b(ch10D10) 시스테인 조작된 항-CD79b 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 다음 중쇄 서열 (서열 269-277, 표 4) 중 하나 이상을 포함한다.

표 4

항-cynoCD79b(ch10D10) 시스템인 조작된 항-CD79b 항체 변이체에 대한 중쇄 순차적인, 카바트 및 EU 넘버링의 비교:

서열	순차적 넘버링	카바트 넘버링	EU 넘버링	서열
EVQLC <u>ES</u> GP	Q5C	Q5C		269
LSLTCC <u>VT</u> GYS	T23C	T23C		270
LNSVT <u>CED</u> TAT	S88C	S84C		271
TTLTVCS <u>AST</u> K	S111C	S112C		272
LTVSSC <u>STK</u> GP	A113C	A114C	A118C	273
VSSAS <u>CKG</u> PSV	T115C	T116C	T120C	274
WYVDG <u>CEV</u> HNA	V282C	V278C	V282C	275
KGFYP <u>CDI</u> AVE	S370C	S371C	S375C	276
PPVLD <u>CGS</u> FF	S395C	S396C	S400C	277

[0739]

[0740]

한 실시태양에 따르면, 인간화 MA79b 시스템인-조작된 항-CD79b 항체는 유리 시스템인 아미노산을 갖는 다음 경쇄 서열 (서열 278-284, 표 5) 중 하나 이상을 포함한다.

표 5

인간화 MA79b 시스템인 조작된 항-CD79b 항체 변이체에 대한 경쇄 순차적 및 카바트 넘버링의 비교

서열	순차적 넘버링	카바트 넘버링	서열
SLSAS <u>CGD</u> RV	V15C	V15C	278
EIKRT <u>CAAP</u> SV	V114C	V110C	279
TVAAP <u>CVFI</u> P	S118C	S114C	280
FIFPP <u>CDEQ</u> LK	S125C	S121C	281
DEQLK <u>CGT</u> ASV	S131C	S127C	282
VTEQD <u>CKD</u> STY	S172C	S168C	283
GLSSP <u>TKSF</u> N	V209C	V205C	284

[0741]

[0742]

한 실시태양에 따르면, 키메라 MA79b 시스템인-조작된 항-CD79b 항체는 유리 시스템인 아미노산을 갖는 다음 경쇄 서열 (서열 285-291, 표 6) 중 하나 이상을 포함한다.

표 6

키메라 MA79b 시스템인 조작된 항-CD79b 항체 변이체에 대한 경쇄 순차적 및 카바트 넘버링의 비교

서열	순차적 넘버링	카바트 넘버링	서열
SLAVS <u>C</u> GQRAT	L15C	L15C	285
ELKRT <u>C</u> AAPSV	V114C	V110C	286
TVAAP <u>C</u> VFIFP	S118C	S114C	287
FIFPP <u>C</u> DEQLK	S125C	S121C	288
DEQLK <u>C</u> GTASV	S131C	S127C	289
VTEQD <u>C</u> KDSTY	S172C	S168C	290
GLSSP <u>C</u> TKSFN	V209C	V205C	291

[0743]

[0744]

한 실시태양에 따르면, 항-cynoCD79b(ch10D10) 시스템인-조작된 항-CD79b 항체는 유리 시스템인 아미노산을 갖는 다음 경쇄 서열 (서열 292-298, 표 7) 중 하나 이상을 포함한다.

표 7

항-cynoCD79b(ch10D10) 시스템인 조작된 항-CD79b 항체 변이체에 대한 경쇄 순차적 및 카바트 넘버링의 비교

서열	순차적 넘버링	카바트 넘버링	서열
SLAVS <u>C</u> GQRAT	L15C	L15C	292
EIKRT <u>C</u> AAPSV	V114C	V110C	293
TVAAP <u>C</u> VFIFP	S118C	S114C	294
FIFPP <u>C</u> DEQLK	S125C	S121C	295
DEQLK <u>C</u> GTASV	S131C	S127C	296
VTEQD <u>C</u> KDSTY	S172C	S168C	297
GLSSP <u>C</u> TKSFN	V209C	V205C	298

[0745]

[0746]

c. 표지된 시스템인 조작된 항-CD79b 항체

[0747]

시스템인 조작된 항-CD79b 항체는 부위-특이적으로 및 효율적으로 티올-반응성 시약과 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다관능성 링커 시약, 포획, 즉 친화도, 표지 시약 (예를 들어 비오틴-링커 시약), 검출 표지 (예를 들어 형광단 시약), 고체상 고정 시약 (예를 들어 SEPHAROSE™, 폴리스티렌, 또는 유리), 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 티올-반응성 시약의 한 예는 N-에틸 말레이미드 (NEM)이다. 예시적인 실시태양에서, ThioFab와 비오틴-링커 시약을 반응시키면 조작된 시스템인 잔기의 존재 및 반응성을 그에 의해 검출 및 측정할 수 있는 비오틴화 ThioFab을 제공한다. ThioFab와 다관능성 링커 시약을 반응시키면 약물 모이어티 시약 또는 다른 표지와 추가로 반응할 수 있는 관능성 링커를 갖는 ThioFab을 제공한다. ThioFab와 약물-링커 중간체를 반응시키면 ThioFab 약물 접합체를 제공한다.

[0748] 본원에 기재된 예시적인 방법은 일반적으로 항체의 확인 및 생산에, 및 보다 일반적으로 본원에 설명된 설계 및 스크리닝 단계의 적용을 통해 다른 단백질에 적용할 수 있다.

[0749] 그러한 방법은 반응성기가 예를 들어 말레이미드, 요오도아세트아미드, 피리딜 디술피드, 또는 다른 티올-반응성 접합 파트너인 다른 티올-반응성 시약의 접합에 적용될 수 있다 ([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]). 티올-반응성 시약은 약물 모이어티, 형광단, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 염료, 영상화 또는 방사성 치료 금속에 대한 킬레이팅제, 펩티딜 또는 비-펩티딜 표지 또는 검출 태그, 또는 소실-변형제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성질체, 제3 성분에 결합하는 펩티드, 또는 다른 탄수화물 또는 친지질성 물질일 수 있다.

[0750] d. 시스테인 조작된 항-CD79b 항체의 용도

[0751] 시스테인 조작된 항-CD79b 항체, 및 그의 접합체는 치료제 및/또는 진단제로서 사용될 수 있다. 본 발명은 추가로 B-세포 관련 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 예방, 관리, 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 포 증식성 장애, 예를 들어 암, 예를 들어, 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종과 연관된 하나 이상의 증상의 예방, 관리, 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 CD79b 관련 질환 또는 상기 질환을 발병할 소인의 진단 방법, 및 B 세포-연관 CD79b 폴리펩티드에 우선적으로 결합하는 항체 및 항체의 항원-결합 단편의 확인 방법을 추가로 제공한다.

[0752] 본 발명의 다른 실시태양은 B 세포 관련 질환에 반응성인 병태의 치료에서 유용한 의약의 제조를 위한 시스테인 조작된 항-CD79b 항체의 용도에 관한 것이다.

[0753] e. 시스테인 조작된 항체 약물 접합체 (Thio-항체 약물 접합체 (TDC))

[0754] 본 발명의 다른 측면은 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 (Ab), 및 아우리스타틴 약물 모이어티 (D)를 포함하는, 하기 화학식 I의 항체-약물 접합체 화합물에 관한 것이고, 여기서 시스테인 조작된 항체는 링커 모이어티 (L)에 의해 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 통해 D에 부착된다:

[0755] <화학식 I>



[0757] 여기서, p는 1, 2, 3, 또는 4이고; 시스테인 조작된 항체는 모 항-CD79b 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산으로 교체하는 것을 포함하는 공정에 의해 제조된다.

[0758] 본 발명의 다른 측면은 화학식 I의 항체-약물 화합물의 혼합물을 포함하는 조성물이고, 여기서 항체당 평균 약물 로딩은 약 2 내지 약 5, 또는 약 3 내지 약 4이다.

[0759] 도 24-28 및 48-49는 아우리스타틴 약물 모이어티가 경쇄 (LC-ADC) 또는 중쇄 (HC-ADC) 내의 조작된 시스테인기에 부착된, 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 약물 접합체 (ADC)의 실시태양을 보여준다.

[0760] 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 약물 접합체의 잠재적인 잇점은 개선된 안전성 (보다 큰 치료 지수), 개선된 PK 파라미터, 접합체를 안정화시키고 그의 활성 결합 입체형태를 보유할 수 있는 항체 사슬간 디설피드 결합, 잘 규정된 약물 접합의 부위, 및 보다 균질한 생성물을 생성하는, 시스테인 조작된 항체를 약물-링커 시약에 접합시켜 얻은 시스테인 조작된 항체 약물 접합체의 제조를 포함한다.

[0761] 링커

[0762] "링커", "링커", "링커 단위", 또는 "연결하다"는 항체를 약물 모이어티에 공유결합에 의해 부착시키는 공유결합 또는 원자의 사슬을 포함하는 화학적 모이어티를 의미한다. 다양한 실시태양에서, 링커는 L로 표시된다. "링커" (L)은 하나 이상의 약물 모이어티 (D) 및 항체 단위 (Ab)를 연결하여 화학식 I의 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성할 수 있는 2관능성 또는 다관능성 모이어티이다. 항체-약물 접합체 (ADC)는 약물 및 항체에 결합하기 위한 반응성 관능기를 갖는 링커를 사용하여 편리하게 제조할 수 있다. 시스테인 조작된 항체 (Ab)의 시

스테인 티올은 링커 시약, 약물 모이어티 또는 약물-링커 중간체의 친전자성 관능기와 결합을 형성할 수 있다.

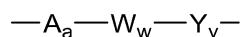
[0763] 한 측면에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친핵 시스템에 반응성인 친전자기를 갖는 반응성 부위를 갖는다. 항체의 시스템 티올은 링커 상의 친전자기와 반응성이고, 링커에 대한 공유결합을 형성한다. 유용한 친전자기는 말레이미드 및 할로아세트아미드기를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0764] 링커는 알킬디일, 아릴디일, 헤테로아릴디일과 같은 이가 라디칼, 알킬옥시의 반복 단위 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (예를 들어, 폴리에틸렌옥시, PEG, 폴리메틸렌옥시), 및 알킬아미노 (예를 들어, 폴리에틸렌아미노, 제프아민™)와 같은 모이어티; 및 숙시네이트, 숙신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트, 및 카프로아미드를 포함하는 이산 에스테르 및 아미드를 포함한다.

[0765] 시스템인 조작된 항체는 문헌 [Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773]의 766페이지의 접합 방법, 및 실시예 6의 프로토콜에 따라 링커 시약 또는 약물-링커 중간체, 친전자성 관능기, 예를 들어 말레이미드 또는 α -할로 카르보닐과 반응한다.

[0766] 링커는 하나 이상의 링커 성분으로 이루어질 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe" 또는 "af"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미드 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미드 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카복실레이트 ("SMCC"), N-숙신이미드 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB"), 하나 이상의 반복 단위로서의 에틸렌옥시 $-CH_2CH_2O-$ ("EO" 또는 "PEO")를 포함한다. 추가의 링커 성분은 당업계에 공지되어 있고, 일부를 본원에 기재한다.

[0767] 한 실시태양에서, ADC의 링커 L은 하기 화학식으로 표시된다:



[0768]

[0769] 상기 식에서, -A-는 항체 (Ab)의 시스템 티올에 공유결합에 의해 부착된 스트레처 단위이고;

[0770] a는 0 또는 1이고;

[0771] 각각의 W는 독립적으로 아미노산 단위이고;

[0772] w는 독립적으로 0 내지 12의 정수이고;

[0773] -Y-는 약물 모이어티에 공유결합에 의해 부착된 스페이서 단위이고;

[0774] y는 0, 1, 또는 2이다.

[0775] 스트레처 단위

[0776] 스트레처 단위 (-A-)는 존재하는 경우, 항체 단위를 아미노산 단위 (-W-)에 연결시킬 수 있다. 이와 관련하여, 항체 (Ab)는 스트레처의 관능기와 결합을 형성할 수 있는 관능기를 갖는다. 자연적으로 또는 화학 조작을 통해 항체 상에 존재할 수 있는 유용한 관능기는 술포히드릴 (-SH), 아미노, 히드록실, 카복시, 탄수화물의 아노머 히드록실기, 및 카복실기를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 한 측면에서, 항체 관능기는 술포히드릴 또는 아미노이다. 술포히드릴기는 항체의 분자내 디설피드 결합의 환원에 의해 생성될 수 있다. 별법으로, 술포히드릴기는 2-이미노티올란 (트라우트 시약) 또는 다른 술포히드릴 생성 시약을 사용한 항체의 리신 모이어티의 아미노기의 반응에 의해 생성될 수 있다. 한 실시태양에서, 항체 (Ab)는 스트레처 단위의 친전자성 관능기와 결합을 형성할 수 있는 유리 시스템 티올기를 갖는다. 화학식 I의 접합체에서 예시적인 스트레처 단위를 화학식 II 및 III에 도시하고, 여기서 Ab-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기 정의된 바와 같고, R^{17} 은 $(CH_2)_r$, $-C_3-C_8$ 카르보시클릴, $-O-(CH_2)_r$, 아릴렌, $(CH_2)_r$ -아릴렌-, $-아릴렌-(CH_2)_r-$, $(CH_2)_r-(C_3-C_8$ 카르보시클릴), $-(C_3-C_8$ 카르보시클릴) $-(CH_2)_r$, $-C_3-C_8$ 헤테로시클릴, $(CH_2)_r-(C_3-C_8$ 헤테로시클릴), $-(C_3-C_8$ 헤테로시클릴) $-(CH_2)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, 및 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$ 로부터 선택되는 이가 라디칼이고; 여기서 R^b 는 H, C_1-C_6 알킬, 페닐, 또는 벤질이고; r은 독립적으로 1-10의 정수이다.

[0777] 아릴렌은 방향족 고리계로부터 2개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 6-20개 탄소 원자의 이가 방향족 탄화수소 라디칼을 포함한다. 전형적인 아릴렌기는 벤젠, 치환 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 비페닐 등으로부터 유도된 라디칼을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

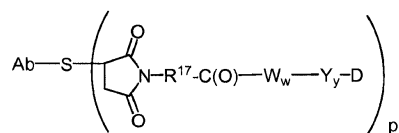
[0778] 헤테로시클링기는 하나 이상의 고리 원자가 헤테로원자, 예를 들어, 질소, 산소, 및 황인 고리계를 포함한다. 헤테로사이클 라디칼은 탄소 원자 1 내지 20개, 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개를 포함한다. 헤테로사이클은 3 내지 7고리원을 갖는 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개, 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개)일 수 있거나, 또는 7 내지 10고리원을 갖는 바이사이클 (탄소 원자 4 내지 9개, 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개), 예를 들어 바이시클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다. 헤테로사이클은 문헌 ([Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 특히 제1, 3, 4, 6, 7, 및 9장]; ["The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), 특히 제13, 14, 16, 19 및 28권]; 및 [J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566]에 기재되어 있다.

[0779] 헤테로사이클의 예는 피리딘, 디히드로피리딘, 테트라히드로피리딘 (피페리딘), 티아졸릴, 테트라히드로티오펜, 황 산화 테트라히드로티오펜, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로푸라닐, 비스-테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아다지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴놀살리닐, 퀴나졸리닐, 시놀리닐, 프테리디닐, 4Ah-카르바졸릴, 카르바졸릴, β-카르볼리닐, 페난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 페난트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 푸라자닐, 페녹사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모르폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐 및 이사티노일을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0780] 카르보시클링기는 모노사이클로서 탄소 원자 3 내지 7개, 또는 바이사이클로서 탄소 원자 7 내지 12개를 갖는 포화 또는 불포화 고리를 포함한다. 모노시클릭 카르보사이클은 고리 원자 3 내지 6개, 보다 일반적으로 고리 원자 5 또는 6개를 갖는다. 바이시클릭 카르보사이클은 예를 들어 바이시클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 7 내지 12개의 고리 원자, 또는 바이시클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 9 또는 10개의 고리 원자를 갖는다. 모노시클릭 카르보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, 1-시클로헥스-1-에닐, 1-시클로헥스-2-에닐, 1-시클로헥스-3-에닐, 시클로헵틸, 및 시클로옥틸을 포함한다.

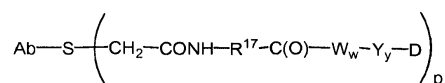
[0781] 화학식 I의 ADC의 모든 예시적인 실시태양, 예를 들어 화학식 II-VI로부터, 명확하게 도시되지 않은 경우에도 조작된 시스템 잔기의 수에 따라 1 내지 4개의 약물 모이어티가 항체 (p = 1-4)에 연결됨을 이해해야 한다.

[0782] [화학식 II]



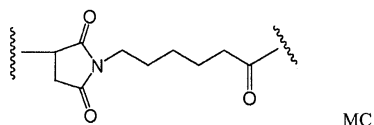
[0783]

[0784] [화학식 III]



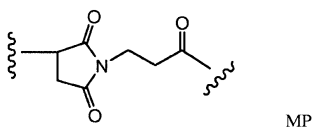
[0785]

[0786] 화학식 II의 예시적인 스트레처 단위는 R^{17} 이 $-(CH_2)_5-$ 이고, 말레이미도카프로일 (MC)로부터 유도된다:



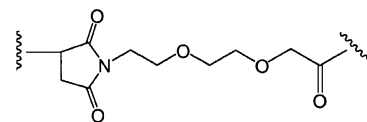
[0787]

[0788] R^{17} 이 $-(CH_2)_2-$ 이고, 말레이미도-프로파노일 (MP)로부터 유도된 화학식 II의 예시적인 스트레처 단위:



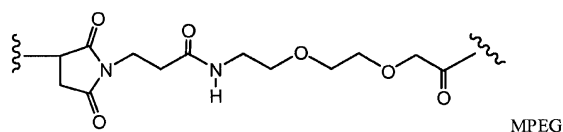
[0789]

[0790] R^{17} 이 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 이고, r 이 2인 화학식 II의 예시적인 다른 스트레처 단위:



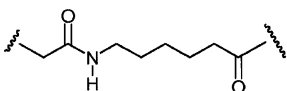
[0791]

[0792] R^{17} 이 $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 이고, R^b 가 H이고 각각의 r 이 2인 화학식 II의 예시적인 다른 스트레처 단위:



[0793]

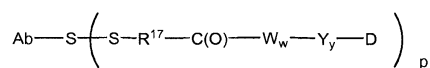
[0794] R^{17} 이 $-(CH_2)_5-$ 인 화학식 III의 예시적인 스트레처 단위:



[0795]

[0796] 다른 실시태양에서, 스트레처 단위는 항체의 조작된 시스테인 황 원자와 스트레처 단위의 황 원자 간의 디설피드 결합을 통해 시스테인 조작된 항-CD79b 항체에 연결된다. 상기 실시태양의 대표적인 스트레처 단위는 하기 화학식 IV에 도시되고, 여기서 R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다.

[0797] [화학식 IV]

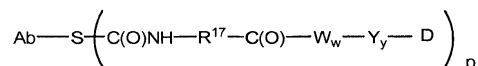


[0798]

[0799] 또다른 실시태양에서, 스트레처의 반응기는 항체의 유리 시스테인 티올과 결합을 형성할 수 있는 티올-반응성 관능기를 함유한다. 티올-반응성 관능기의 예는 말레이미드, α -할로아세틸, 활성화된 에스테르, 예를 들어 숙신이미드 에스테르, 4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수물, 산 클로라이드, 술폰일 클로라이드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

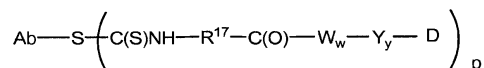
[0800] 상기 실시태양의 대표적인 스트레처 단위는 하기 화학식 Va 및 Vb에 도시되고, 여기서 $-R^{17}-$, Ab-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다.

[0801] [화학식 Va]



[0802]

[0803] [화학식 Vb]



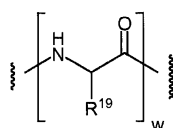
[0804]

[0805] 다른 실시태양에서, 링커는 하나 초과와 약물 모이어티를 분지화 다관능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 ([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]). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관계가 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로딩을 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 단지 하나의 반응성 시스테인 티올기를 보유하는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통하여 부착시킬 수 있다.

[0806] 아미노산 단위

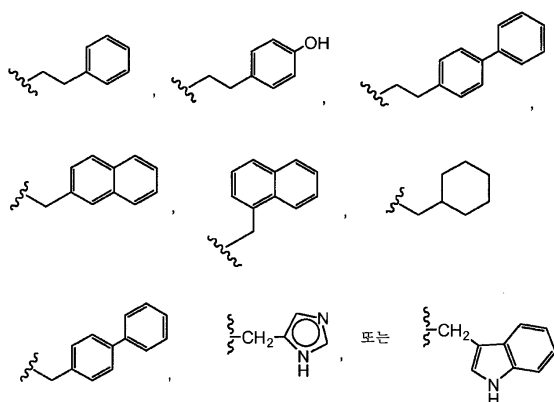
[0807] 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 아미노산 단위 ($-\text{W}_w-$)는 존재하는 경우에 본 발명의 시스테인 조작된 항체-약물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)에 항체 (Ab)를 연결시킨다.

[0808] $-\text{W}_w-$ 는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 헵타펩티드, 옥타펩티드, 노나펩티드, 데카펩티드, 운데카펩티드 또는 도데카펩티드 단위이다. 아미노산 단위를 포함하는 아미노산 잔기는 자연 발생 아미노산, 및 또한 소수의 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함한다. 각각의 $-\text{W}_w-$ 단위는 독립적으로 하기 꺾쇠 괄호 내에 표시된 화학식으로 표시되고, w는 0 내지 12의 정수이다:



[0809]

[0810] 상기 식에서, R^{19} 는 수소, 메틸, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, 벤질, p-히드록시벤질, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-피리딜메틸-, 3-피리딜메틸-, 4-피리딜메틸-, 페닐, 시클로헥실,



이다.

[0811] R^{19} 가 수소 이외의 다른 기인 경우에, R^{19} 가 부착되는 탄소 원자는 키랄이다. R^{19} 가 부착되는 각각의 탄소 원자는 독립적으로 (S) 또는 (R) 입체형태, 또는 라세미 혼합물로 존재한다. 따라서, 아미노산 단위는 거울상 이성질체적으로 순수하거나, 라세미체, 또는 부분 입체 이성질체일 수 있다.

[0812] 예시적인 $-W_w$ -아미노산 단위는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 천연 발생 아미노산 잔기, 및 소수의 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함한다.

[0813] 아미노산 단위는 종양-연관 프로테아제를 포함한 하나 이상의 효소에 의해 효소적으로 절단되어 약물 모이어티 (-D)를 방출시킬 수 있으며, 한 실시태양에서, 이는 약물 모이어티 방출시에 생체 내에서 양성자첨가되어 약물 (D)를 제공한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양-연관 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그의 선택성을 고려하여 설계되고 최적화될 수 있다.

[0814] 스페이서 단위

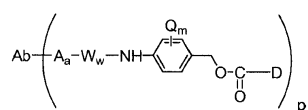
[0815] 스페이서 단위 ($-Y_y-$)는 존재하는 경우 ($y = 1$ 또는 2), 아미노산 단위가 존재할 때 ($w = 1-12$) 아미노산 단위 ($-W_w-$)를 약물 모이어티 (D)에 연결시킨다. 별법으로, 스페이서 단위는 아미노산 단위가 부재할 때 스트레처 단위를 약물 모이어티에 연결시킨다. 아미노산 단위 및 스트레처 단위가 모두 부재할 때 ($w, y = 0$), 스페이서 단위는 또한 약물 모이어티를 항체 단위에 연결시킨다. 스페이서 단위는 자가 희생적 및 비-자가 희생적의 두 종류가 존재한다. 비-자가 희생적 스페이서 단위는 항체-약물 접합체 또는 약물 모이어티-링커로부터 아미노산 단위의 절단, 특히 효소적 절단 후에 일부 또는 모든 스페이서 단위가 약물 모이어티에 결합된 상태로 유지되는 단위이다. 글리신-글리신 스페이서 단위 또는 글리신 스페이서 단위를 포함하는 ADC가 종양 세포 연관 프로테아제, 암 세포 연관 프로테아제 또는 림프구 연관 프로테아제를 통한 효소적 절단을 거칠 경우, 글리신-글리신-약물 모이어티 또는 글리신-약물 모이어티는 $Ab-A_w-W_w$ -로부터 절단된다. 한 실시태양에서, 독립적인 가수분해 반응이 표적 세포 내에서 일어나, 글리신-약물 모이어티 결합을 절단하여 약물을 방출시킨다.

[0816] 다른 실시태양에서, $-Y_y-$ 는 그의 페닐렌 부분이 Q_m 으로 치환된 p-아미노벤질카르바모일 (PAB) 단위이고, 여기서 Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이다.

[0817] 비-자가 희생적 스페이서 단위 ($-Y-$)의 예시적인 실시태양은 $-Gly-Gly-$; $-Gly-$; $-Ala-Phe-$; $-Val-Cit-$ 이다.

[0818] 한 실시태양에서, 스페이서 단위가 부재하는 ($y=0$) 약물 모이어티-링커 또는 ADC, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 제공한다.

[0819] 별법으로, 자가 희생적 스페이서 단위를 포함하는 ADC는 -D를 방출할 수 있다. 한 실시태양에서, $-Y-$ 는 PAB기의 아미노 질소 원자를 통해 $-W_w$ -에 연결되고 카르보네이트, 카르바메이트 또는 에테르기를 통해 -D에 직접 연결된 PAB기이고, 여기서 ADC는 다음 예시적인 구조를 갖는다:

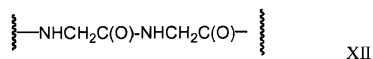
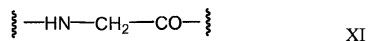
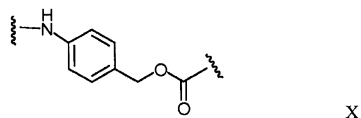


[0820]

[0821] 여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이고, p는 1 내지 4이다.

[0822] 자가 희생적 스페이서의 다른 예는 PAB기에 전기적으로 유사한 방향족 화합물, 예를 들어 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), 헤테로시클릭 PAB 유사체 (US 2005/0256030), 베타-글루쿠로나이드 (WO 2007/011968), 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 아마이드 결합 가수분해시에 고리화되는 스페이서, 예를 들어 치환 및 비치환된 4-아미노부티르산 아마이드 (Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2:223); 적절하게 치환된 바이시클로[2.2.1] 및 바이시클로[2.2.2] 고리계 (Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815); 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드 (Amsberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55:5867)를 사용할 수 있다. 글리신에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27:1447)도 또한 ADC에서 유용한 자가 희생적 스페이서의 예이다.

[0823] 예시적인 스페이서 단위 (-Y_y-)는 화학식 X-XII로 표시된다:

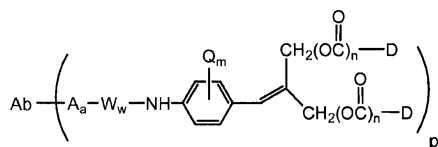


[0824]

[0825] 수지상 링커

[0826] 다른 실시태양에서, 링커 L은 1개 초과와 약물 모이어티를 분지화 다관능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 ([Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관계가 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로딩을 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스템인 조작된 항체가 단지 하나의 반응성 시스테인 티올기를 보유하는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통하여 부착시킬 수 있다. 분지형 수지상 링커의 예시적인 실시태양은 2,6-비스(히드록시메틸)-p-크레졸 및 2,4,6-트리스(히드록시메틸)-페놀 덴드리머 단위를 포함한다 (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]).

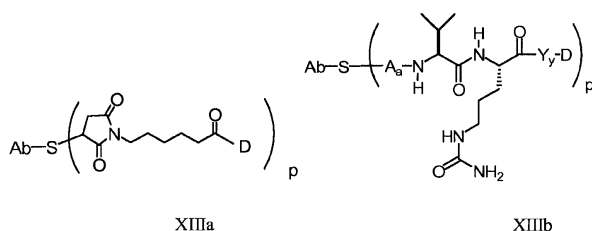
[0827] 한 실시태양에서, 스페이서 단위는 2-(4-아미노벤질리덴)프로판-1,3-디올 덴드리머 단위 (WO 2004/043493; [de Groot et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494])를 포함하는, 아래에 제시된 구조를 갖는 분지쇄 비스(히드록시메틸)스티렌 (BHMS)이고, 이것은 다수의 약물을 도입하고 방출시키기 위해 사용될 수 있다.



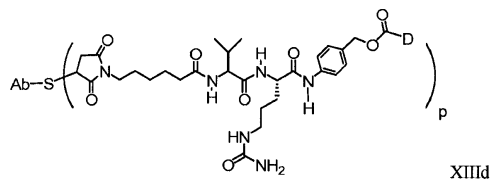
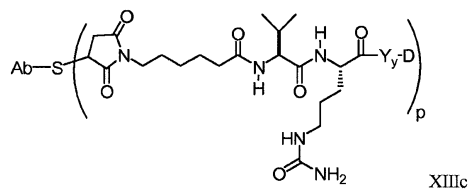
[0828]

[0829] 여기서, Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이고, n은 0 또는 1이고; p는 1 내지 4이다.

[0830] 화학식 I의 항체-약물 접합체 화합물의 예시적인 실시태양은 화학식 XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit), 및 XIId (MC-val-cit-PAB)의 화합물을 포함한다:



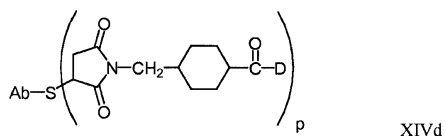
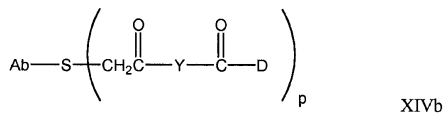
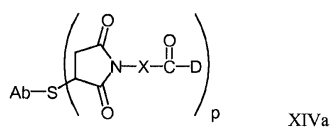
[0831]



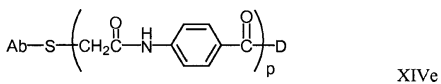
[0832]

[0833]

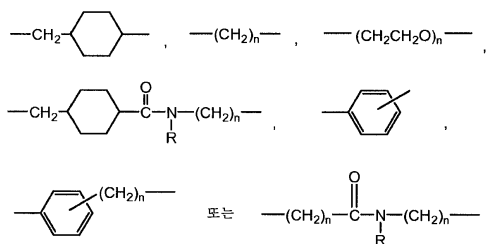
화학식 Ia의 항체-약물 접합체 화합물의 다른 예시적인 실시태양은 하기 화학식 XIVa-e의 화합물을 포함한다:



[0834]



[0835]



[0836]

여기서, X는 이고,

[0837]

Y는 이고,

[0838]

R은 독립적으로 H 또는 C₁-C₆ 알킬이고; n은 1 내지 12이다.

[0839]

다른 실시태양에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친전자기에 반응성인 친핵기를 갖는 반응성 관능기를 갖는다. 항체 상의 유용한 친전자기는 알데하이드 및 케톤 카르보닐기를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 링커의 친핵기의 히드로원자는 항체 상의 친전자기와 반응하여 항체 단위에 공유결합을 형성할 수 있다. 링커 상의 유용한

친핵기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 항체 상의 친전자기는 링커에 대한 편리한 부착 부위를 제공한다.

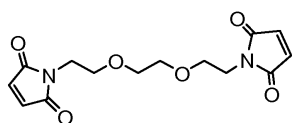
[0840] 전형적으로, 펩티드형 링커는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이에 펩티드 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 그러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 잘 알려져 있는 액상 합성 방법 (E. Schroeder and K. Luebke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)에 따라 제조할 수 있다. 링커 중간체는 스페이서, 스트레처 및 아미노산 단위를 포함한 임의의 조합물 또는 반응의 서열과 조립될 수 있다. 스페이서, 스트레처 및 아미노산 단위는 특성상 친전자성, 친핵성, 또는 유리 라디칼인 반응성 관능기를 이용할 수 있다. 반응성 관능기는 카르복실, 히드록실, 파라-니트로페닐카르보네이트, 이소티오시아네이트, 및 이탈기, 예를 들어 O-메실, O-토실, -Cl, -Br, -I; 또는 말레이미드를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0841] 예를 들어, 하전된 치환체, 예를 들어 술포네이트 ($-SO_3^-$) 또는 암모늄은 시약의 수용성을 증가시키고, 링커 시약과 항체 또는 약물 모이어티와의 커플링 반응을 용이하게 하거나, 또는 ADC 제조에 사용되는 합성 경로에 따라 Ab-L (항체-링커 중간체)과 D, 또는 D-L (약물-링커 중간체)과 Ab와의 커플링 반응을 용이하게 할 수 있다.

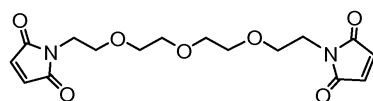
[0842] 링커 시약

[0843] 항체 및 아우리스타틴의 접합체는 다양한 2관능성 링커 시약, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피디메이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다.

[0844] 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약: 즉, BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술포)벤조에이트), 및 비스-말레이미드 시약; 즉, DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-비스-말레이미도디에틸렌글리콜 BM(PEO)₂, 및 1,11-비스-말레이미도트리에틸렌글리콜 BM(PEO)₃ (이는 피어스 바이오테크놀로지, 인크., 써모사이언티픽 (ThermoScientific) (미국 일리노이주 록포드) 및 다른 시약 공급처로부터 상업적으로 이용가능함)을 사용하여 제조할 수 있다. 비스-말레이미드 시약은 시스테인 조작된 항체의 티올기를 순차적 또는 동시 방식으로, 티올-함유 약물 모이어티, 표지 또는 링커 중간체에 부착시킬 수 있게 해준다. 시스테인 조작된 항체의 티올기, 약물 모이어티, 표지, 또는 링커 중간체와 반응성인, 말레이미드 이외의 다른 관능기는 요오도아세트아미드, 브로모아세트아미드, 비닐 피리딘, 디술폰, 피리딜 디술폰, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함한다.



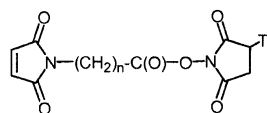
BM(PEO)₂



BM(PEO)₃

[0845] 유용한 링커 시약은 또한 다른 공급처, 예를 들어 몰레큘라 바이오사이언시스 인크. (Molecular Biosciences Inc., 미국 콜로라도주 보울더)를 통해 입수할 수 있거나, 또는 문헌 ([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; 및 WO 04/032828)에 설명된 절차에 따라 합성할 수 있다.

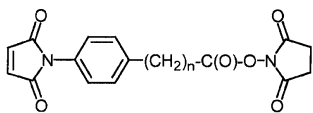
[0847] 화학식 IIIa의 스트레처는 하기 링커 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커 내로 도입할 수 있다:



[0848]

[0849]

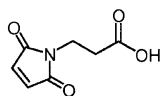
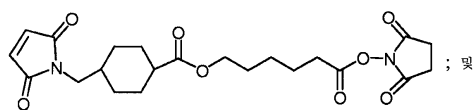
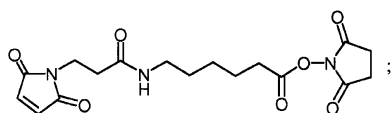
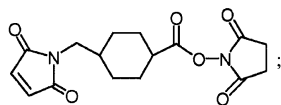
(여기서, n은 1-10의 정수이고, T는 -H 또는 -SO₃Na이다),



[0850]

[0851]

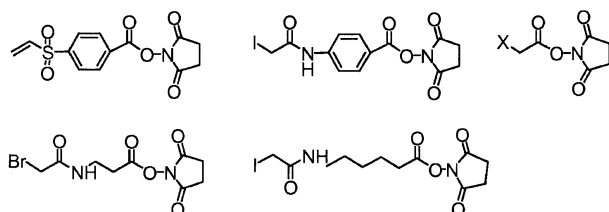
(여기서, n은 0-3의 정수이다);



[0852]

[0853]

스트레처 단위는 하기 2관능성 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커 내로 도입할 수 있다:



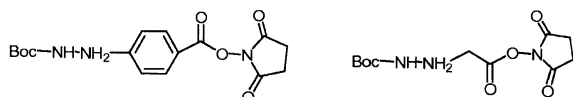
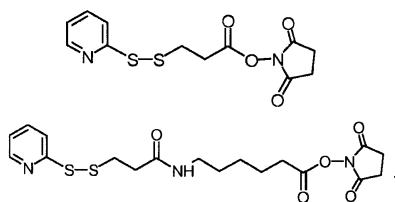
[0854]

[0855]

여기서, X는 Br 또는 I이다.

[0856]

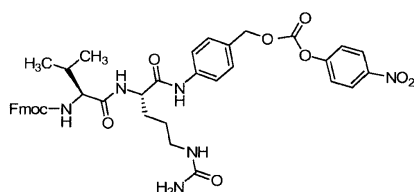
스트레처 단위는 또한 하기 2관능성 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커 내로 도입할 수 있다:



[0857]

[0858]

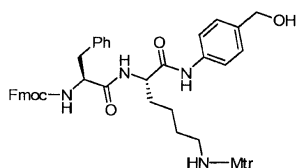
말레이미드 스트레처 및 파라-아미노벤질카르바모일 (PAB) 자가 희생적 스페이서를 갖는 예시적인 발린-시트룰린 (val-cit 또는 vc) 디펩티드 링커 시약은 다음 구조를 갖는다:



[0859]

[0860]

말레이미드 스트레처 단위 및 PAB 자가 희생적 스페이서 단위를 갖는 예시적인 phe-lys(Mtr, 모노-4-메톡시트리틸) 디펩티드 링커 시약은 문헌 [Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60]에 따라 제조할 수 있고, 다음 구조를 갖는다:



[0861]

[0862]

시스테인 조작된 항-CD79b 항체-약물 접합체의 제조

[0863]

화학식 I의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 몇몇 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 시스테인 조작된 항체의 시스테인기를 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 활성화된 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵기를 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 약물-링커 중간체 D-L을 형성시킨 후, 이를 시스테인 조작된 항체의 시스테인기와 반응시키는 방법. 접합 방법 (1) 및 (2)에서는 다양한 시스테인 조작된 항체, 약물 모이어티 및 링커를 사용하여 화학식 I의 항체-약물 접합체를 제조할 수 있다.

[0864]

항체 시스테인 티올기는 친핵성이고, (i) 활성 에스테르, 예를 들어, NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어, 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기; 및 (iv) 디설피드, 예를 들어 피리딜 디설피드 (설피드 교환을 통한)를 포함하는, 링커 시약 및 약물-링커 중간체 상의 친전자기와 공유결합을 형성할 수 있다. 약물 모이어티 상의 친핵기는 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자기와 반응하여 공유결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라이드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라이드기를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0865]

시스테인 조작된 항체는 환원제, 예를 들어 DTT (클레랜드 (Cleland) 시약, 디티오프레이톨) 또는 TCEP (트리스 (2-카르복시에틸)포스핀 염산염; [Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80]; 솔텍 벤처스 (Soltec Ventures, 미국 매사추세츠주 베벌리))로 처리한 후, 재산화시켜 사슬간 및 사슬내 디설피드 결합을 재형성함으로써 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다 (실시예 5). 예를 들어, CHO 세포에서 발현시킨 전장 시스테인 조작된 모노클로날 항체 (ThioMab)를 약 50배 물과량의 TCEP로 3 hr 동안 37°C에서 환원시켜, 새

로 도입된 시스테인 잔기와 배양 배지 내에 존재하는 시스테인 사이에 형성할 수 있는 시스테인 부가물 내의 디설피드 결합을 환원시킨다. 환원된 ThioMab을 희석하고, HiTrap S 컬럼 상으로 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 내에서 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용출시킨다. 디설피드 결합은 실온에서 철야로 묶은 (200 nM) 수성 황산구리 (CuSO_4)를 사용하여 모 Mab 내에 존재하는 시스테인 잔기들 사이에서 재확립되었다. 별법으로, 데히드로아스코르브산 (DHAA)이 시스테인 부가물의 환원적 절단 후에 시스테인 조작된 항체의 사슬내 디설피드 결합을 재확립하기 위해 효과적인 산화제이다. 당업계에 공지된 다른 산화제, 즉, 산화제, 및 산화 조건을 사용할 수 있다. 주변 공기 산화가 또한 효과적이다. 상기 약한 부분 재산화 단계는 높은 정확도로 사슬내 디설피드를 효율적으로 형성하고, 새로 도입된 시스테인 잔기의 티올기를 보존한다. 약 10배 과량의 약물-링커 중간체, 예를 들어 MC-vc-PAB-MMAE를 첨가하고, 혼합하고, 약 1시간 동안 실온에서 정치시켜 접합을 수행하고 항-CD79b 항체-약물 접합체를 형성시켰다. 접합 혼합물을 겔 여과하고, HiTrap S 컬럼에 로딩하고 그를 통해 용출시켜 과잉의 약물-링커 중간체 및 다른 불순물을 제거하였다.

[0866]

도 23은 접합을 위한 세포 배양액으로부터 발현된 시스테인 조작된 항체를 제조하기 위한 일반적인 공정을 도시한 것이다. 세포 배양 배지가 시스테인을 함유하면, 디설피드 부가물이 새로 도입된 시스테인 아미노산과 배지로부터의 시스테인 사이에 형성될 수 있다. 도 23에서 예시적인 ThioMab (좌측)에서 원으로 표시한 이들 시스테인 부가물은 환원되어 접합에 반응성인 시스테인 조작된 항체를 생성해야 한다. 시스테인 부가물은 아마도 다양한 사슬간 디설피드 결합과 함께, TCEP와 같은 환원제를 사용하여 환원적으로 절단되어 환원된 형태의 항체를 제공한다. 쌍을 이룬 시스테인 잔기들 사이의 사슬간 디설피드 결합은 황산구리, DHAA, 또는 주변 산소에의 노출을 이용한 부분 산화 조건 하에 재형성된다. 새로 도입되고, 조작되고, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기는 링커 시약 또는 약물-링커 중간체와의 반응을 위해 이용가능하게 남아, 본 발명의 항체 접합체를 형성한다. 포유동물 세포주에서 발현된 ThioMab은 -S-S- 결합 형성을 통해 조작된 Cys에 대해 외부에서 접합된 Cys 부가물을 생성시킨다. 따라서, 정제된 ThioMab을 실시예 5에 설명된 바와 같은 환원 및 재산화 절차로 처리하여 반응성 ThioMab을 생산한다. 이들 ThioMab은 세포독성 약물, 형광단, 및 다른 표지를 함유한 말레이미드와 접합하기 위해 사용된다.

[0867]

10. 면역리포솜

[0868]

본원에 개시된 항-CD79b 항체는 또한 면역리포솜으로서 제제화될 수 있다. "리포솜"은 약물을 포유동물에게 전달하기 위해 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 리포솜의 성분들은 통상적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 2층 구조로 배열된다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌 ([Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980)]; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545; 및 1997년 10월 23일 공개된 W097/38731)에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 향상된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 5,013,556에 개시되어 있다.

[0869]

특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 생성할 수 있다. 리포솜은 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득하도록 규정된 공극 크기의 필터를 통해 압출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설피드 상호교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 접합할 수 있다. 화학요법제는 임의로 리포솜 내에 함유된다 ([Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)] 참조).

[0870]

B. 특정 항체의 제조 방법

[0871]

1. 목적하는 특성을 갖는 항-CD79b 항체에 대한 스크리닝

[0872]

CD79b 폴리펩티드에 결합하는 항체를 생산하는 기술은 상기 설명되었다. 목적하는 경우에 특정 생물학적 특성을 갖는 항체를 추가로 선택할 수 있다.

[0873]

본 발명의 항-CD79b 항체의 성장 억제 효과는 당업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 내인성으로 또는 CD79b 유전자로 형질감염된 후 CD79b 폴리펩티드를 발현하는 세포를 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 적절한 종양 세포주 및 CD79b로 형질감염된 세포를 수일 (예를 들어, 2-7일) 동안 다양한 농도의 항-CD79b 모노클로날 항체로 처리하고, 크리스탈 바이올렛 또는 MTT로 염색하거나, 일부 다른 비색 분석에 의해 분석할 수 있다. 증식을 측정하는 또다른 방법은 본 발명의 항-CD79b 항체의 존재 또는 부재 하에 처리된 세포에 의한 ^3H -티미딘 흡수를 비교하는 것일 것이다. 처리 후에, 세포를 수거하고, DNA 내로 혼입된 방사성의 양을 섬광 계수기에서 정

량한다. 적절한 양성 대조군은 선택된 세포주를 세포주의 성장을 억제하는 것으로 공지된 성장 억제 항체로 처리하는 것을 포함한다. 생체 내에서 종양 세포의 성장 억제는 당업계에 공지된 다양한 방식으로 결정할 수 있다. 종양 세포는 CD79b 폴리펩티드를 과다발현하는 것일 수 있다. 항-CD79b 항체는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 CD79b-발현 종양 세포의 세포 증식을 미처리된 종양 세포에 비해, 한 실시태양에서 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도에서 약 25-100%, 보다 바람직하게는 약 30-100%, 훨씬 더 바람직하게는 약 50-100% 또는 70-100%까지 억제할 것이다. 성장 억제는 세포 배양액 중의 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 약 0.5 nM 내지 200 nM의 항체 농도에서 측정할 수 있고, 여기서 성장 억제는 종양 세포를 항체에 노출시킨지 1-10일 후에 결정한다. 항체는 항-CD79b 항체를 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg 체중으로 투여할 때 항체의 제1 투여로부터 약 5일 내지 3개월 내에, 바람직하게는 약 5 내지 30일 내에 종양 크기를 감소시키거나 종양 세포 증식을 감소시킬 경우에 생체 내에서 성장 억제성이다.

[0874]

세포 사멸을 유도하는 항-CD79b 항체에 대해 선택하기 위해, 예를 들어 요오드화프로피듐 (PI), 트리판 블루 또는 7AAD 흡수에 의해 표시되는 바와 같은 막 통합성의 상실을 대조군에 비해 평가할 수 있다. PI 흡수 분석은 보체 및 면역 효과기 세포의 부재 하에 수행할 수 있다. CD79b 폴리펩티드-발현 종양 세포를 배지 단독으로 또는 적절한 항-CD79b 항체 (예를 들어, 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로)를 함유하는 배지와 함께 인큐베이팅한다. 세포를 3일 동안 인큐베이팅한다. 각각의 처리 후에, 세포를 세척하고, 세포 덩어리를 제거하기 위해 35 mm의 스트레이너 (strainer) 마개가 있는 12 x 75 튜브 (1 ml/튜브, 처리군 당 3개 튜브) 내로 분취한다. 이어서, 튜브에 PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣는다. 샘플을 FACSCAN® 유동 세포 측정기 및 FACSCONVERT® CellQuest 소프트웨어 (백톤 디킨슨 (Becton Dickinson))를 사용하여 분석할 수 있다. PI 흡수에 의해 결정할 때 통계학상 유의한 수준의 세포 사멸을 유도하는 항-CD79b 항체를 세포 사멸-유도 항-CD79b 항체로서 선택할 수 있다.

[0875]

관심있는 항체가 결합하는 CD79b 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석은 시험 항체가 공지의 항-CD79b 항체와 동일한 부위 또는 에피토프에 결합하는지를 결정하는데 사용할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 에피토프 매핑을 당업계에 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 접착 잔기를 확인하기 위해 항체 서열을 알라닌 스캐닝에 의해서와 같이 돌연변이시킬 수 있다. 돌연변이체 항체는 초기에 적합한 폴딩을 보장하기 위해 폴리클로날 항체와의 결합에 대해 시험된다. 상이한 방법에서, CD79b 폴리펩티드의 상이한 영역에 대응하는 펩티드를 시험 항체와의, 또는 시험 항체 및 특성이 결정되거나 공지된 에피토프를 갖는 항체와의 경쟁 분석에 사용할 수 있다.

[0876]

2. 특정 라이브러리 스크리닝 방법

[0877]

본 발명의 항-CD79b 항체는 목적하는 활성(들)을 갖는 항체를 스크리닝하기 위해 조합 라이브러리를 사용함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특징을 갖는 항체에 대하여 상기 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 그러한 방법은 일반적으로 문헌 [Hoogenboom et al. (2001) in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ)]에 기재되어 있고, 특정 실시태양에서는 문헌 [Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093]에 기재되어 있다.

[0878]

원칙적으로, 합성 항체 클론은 파지 코트 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는, 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 선택된다. 그러한 파지 라이브러리를 목적하는 항원에 대한 친화도 크로마토그래피에 의해 패닝(panning)한다. 목적하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론은 항원에 흡착되어, 라이브러리 내의 비-결합 클론으로부터 분리된다. 이어서, 결합 클론을 항원으로부터 용출시키고, 추가 사이클의 항원 흡착/용출에 의해 더욱 농축시킬 수 있다. 본 발명의 임의의 항-CD79b 항체는 관심있는 파지 클론에 대해 선택하기 위해 적합한 항원 스크리닝 절차를 설계한 후, 목적하는 파지 클론으로부터 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 설명된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항-CD79b 항체 클론을 구성함으로써 얻을 수 있다.

[0879]

특정 실시태양에서, 항체의 항원 결합 도메인은 둘 모두 3개의 초가변 루프 (HVR) 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 제시하는 약 110개 아미노산의 2개의 가변 (V) 영역 (경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)로부터 각각 하나씩)으로부터 형성된다. 가변 도메인은 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 설명된 바와 같이 단일쇄 Fv (scFv) 단편으로서 (여기서, VH 및 VL은 짧은 가요성 펩티드를 통해 공유 연결된다), 또는 Fab 단

편으로서 (여기서, 이들을 각각 불변 도메인에 융합되고, 비공유 상호작용한다) 파지 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에서 사용될 때, scFv 코딩 파지 클론 및 Fab 코딩 파지 클론은 "Fv 파지 클론" 또는 "Fv 클론"으로서 총칭된다.

[0880] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 설명된 바와 같이 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 따로 클로닝되고, 파지 라이브러리 내에서 무작위로 재조합될 수 있고, 이어서 이는 항원 결합 클론에 대해 탐색될 수 있다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 제작할 필요 없이 면역원에 고-친화도 항체를 제공한다. 별법으로, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)]에 설명된 바와 같이, 임의의 면역화 없이 광범위한 비-자가 및 또한 자가 항원에 대해 인간 항체의 단일 공급원을 제공하도록, 나이브 레퍼토리를 클로닝할 수 있다. 마지막으로, 나이브 라이브러리는 또한 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 설명된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 세그먼트를 클로닝하고, 고도 가변 CDR3 영역을 코딩하도록 및 시험관 내 재배열을 달성하도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써 합성 방식으로 제조할 수 있다.

[0881] 특정 실시태양에서, 부 코트 단백질 pIII에의 융합에 의해 항체 단편을 디스플레이하기 위해 필라멘트상 파지가 사용된다. 항체 단편은 단일쇄 Fv 단편으로서 (여기서, VH 및 VL 도메인은 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 설명된 바와 같이 가요성 폴리펩티드 스페이서에 의해 동일한 폴리펩티드 사슬 상에서 연결된다), 또는 Fab 단편으로서 (여기서, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)]에 설명된 바와 같이 하나의 사슬은 pIII에 융합되고, 다른 사슬은 박테리아 숙주 세포 주변세포질 내로 분비되고, 여기서 Fab-코트 단백질 구조의 조립체가 야생형 코트 단백질의 일부를 치환함으로써 파지 표면 상에 디스플레이된다) 디스플레이될 수 있다.

[0882] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수거한 면역 세포로부터 얻어진다. 항-CD79b 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 요망되는 경우에, 대상체를 항체 반응을 일으키도록 CD79b로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포 또는 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 라이브러리 제작을 위해 회수한다. 바람직한 실시태양에서, 항-CD79b 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 CD79b 면역화가 CD79b에 대한 인간 항체를 생산하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 면역글로불린 유전자 어레이를 보유하는 (그리고 기능적 내인성 항체 생산 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-CD79b 항체 반응을 일으킴으로써 얻어진다. 인간 항체-생산 트랜스제닉 마우스의 생성은 아래에 설명된다.

[0883] 항-CD79b 반응성 세포 집단에 대한 추가의 농축은 반응성 세포 집단에 대한 추가의 농축은 예를 들어, CD79b 친화도 크로마토그래피를 사용한 세포 분리 또는 플루오로크롬-표지된 CD79b에 대한 세포의 흡착 후 유동-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 CD79b-특이적 막 결합 항체를 발현하는 B 세포를 단리하기 위해 적합한 스크리닝 절차를 이용함으로써 얻을 수 있다.

[0884] 별법으로, 비면역화 공여체로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL을 사용하면 가능한 항체 레퍼토리를 보다 우수하게 제시하고, 또한 CD79b가 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비-인간) 종을 사용하여 항체 라이브러리를 제작할 수 있다. 시험관 내 항체 유전자 구성을 포함하는 라이브러리를 위해, 재배열되지 않은 항체 유전자 세그먼트를 코딩하는 핵산을 제공하도록 줄기 세포를 대상체로부터 수거한다. 관심있는 면역 세포는 다양한 동물 종, 예를 들어 인간, 마우스, 래트, 토끼, 늑대, 개, 고양이, 돼지, 소, 말, 및 새 종 등으로부터 얻을 수 있다.

[0885] 항체 가변 유전자 세그먼트 (VH 및 VL 세그먼트 포함)를 코딩하는 핵산은 관심있는 세포로부터 회수하고 증폭시킨다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우에, 목적하는 DNA는 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 후, 문헌 [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)]에 설명된 바와 같이 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용하는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써 얻을 수 있다. V 유전자는 문헌 ([Orlandi et al. (1989)] 및 [Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989)])에 설명된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서 역방향 프라이머 및 J-세그먼트 내에 기반한 정방향 프라이머를 사용하여 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭시킬 수 있다. 그러나, cDNA로부터 증폭시키기 위해, 역방향 프라이머는 또한 문헌 [Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991)]에 설명된 바와 같이 리더 (leader) 엑손에 기반할 수 있고, 정방향 프라이머는 문헌 [Sasthy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)]에 설명된 바와 같이 불변 영역 내에 기반할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 ([Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sasthy et al. (1989)])에 설명된 바와 같이 다의성을 프라이머 내에 포함시킬 수 있다. 특정 실시태양에서, 라이브러리 다양

성은 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]의 방법에 설명된 바와 같이 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)]의 방법에 설명된 바와 같이, 면역 세포 핵산 샘플 내에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭시키기 위해 각각의 V-유전자 패밀리에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 최대화된다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 희귀 (rare) 제한 부위를 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 설명된 바와 같이 한 단부에서 태그 (tag)로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 설명된 바와 같이 태그된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입할 수 있다.

[0886]

합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리는 V 유전자 세그먼트로부터 시험관 내에서 유도할 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 세그먼트가 클로닝되고 서열결정되고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)]에 보고됨) 매핑되었고 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)]에 보고됨); 이들 클로닝된 세그먼트 (H1 및 H2 루프의 주요 입체형태를 모두 포함함)는 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 설명된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머를 사용하여 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성하기 위해 사용할 수 있다. VH 레퍼토리는 또한 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)]에 설명된 바와 같이 단일 길이의 긴 H3 루프에 집중된 모든 서열 다양성을 갖도록 제조될 수 있다. 인간 V_K 및 V_L 세그먼트가 클로닝되고 서열결정되었고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하기 위해 사용할 수 있다. 합성 V 유전자 레퍼토리 (VH 및 VL 폴드 (fold)의 범위, 및 L3 및 H3 길이에 기초함)는 상당히 구조적으로 다양한 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭 후에, 생식세포 V-유전자 세그먼트를 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관 내에서 재배열할 수 있다.

[0887]

항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 몇몇 방식으로 함께 조합함으로써 제작할 수 있다. 각각의 레퍼토리는 상이한 벡터 내에서 생성할 수 있고, 벡터는 예를 들어, 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993)]에 설명된 바와 같이 시험관 내에서, 또는 조합 감염, 예를 들어, 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)]에 설명된 loxP 시스템에 의해 생체 내에서 재조합할 수 있다. 생체 내 재조합 방법은 이. 콜라이 형질전환 효율에 의해 부과된 라이브러리 크기의 제한을 극복하기 위해 Fab 단편의 2-사슬 특성을 활용한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리는 하나는 파지미드 내로, 다른 하나는 파지 벡터 내로 따로 클로닝한다. 이어서, 2개의 라이브러리를 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염에 의해 조합하여, 각각의 세포가 상이한 조합을 함유하고 라이브러리 크기가 존재하는 세포의 수 (약 10^{12} 개 클론)에 의해서만 제한되도록 한다. 두 벡터는 모두 생체내 재조합 신호를 함유하여, VH 및 VL 유전자는 단일 레플리콘 상으로 재조합되고, 파지 비리온 내로 동시 패키징된다. 이들 큰 라이브러리는 우수한 친화도 (약 10^{-8} M의 K_d^{-1})의 다수의 다양한 항체를 제공한다.

[0888]

별법으로, 레퍼토리들은 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)]에 설명된 바와 같이 동일한 벡터 내로 순차적으로 클로닝되거나, 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에 설명된 바와 같이 PCR에 의해 함께 조립된 후 클로닝될 수 있다. VH 및 VL DNA를 가요성 펩티드 스페이서를 코딩하는 DNA와 연결시켜 단일쇄 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성하기 위해 PCR 조립을 또한 사용할 수 있다. 또 다른 기술에서, 문헌 [Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)]에 설명된 바와 같이 림프구 내에서 VH 및 VL 유전자를 PCR에 의해 결합시킨 후, 연결된 유전자의 레퍼토리를 클로닝하기 위해 "세포내 PCR 조립"을 사용한다.

[0889]

나이브 라이브러리 (천연 또는 합성의)에 의해 생산된 항체는 중등 친화도 (약 10^6 내지 10^7 M⁻¹의 K_d^{-1})의 것일 수 있지만, 친화도 성숙은 또한 문헌 [Winter et al. (1994), 상기 문헌]에 설명된 바와 같이 2차 라이브러리를 제작하고 그로부터 재선택함으로써 시험관 내에서 모방될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이를 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992)]의 방법에서 오류-허용 (error-prone) 증합효소 (문헌 [Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)]에 보고됨)를 사용함으로써 시험관 내에서 무작위로 도입시킬 수 있다. 추가로, 친화도 성숙은 예를 들어 선택된 개별 Fv 클론에서 관심있는 CDR에 이르는 무작위 서열을 보유한 프라이머를 사용하는 PCR을 이용하여 하나 이상의 CDR을 무작위 돌연변이시키고, 보다 고친화도 클론을 스크리닝함으로써 수행할 수 있다. WO 9607754 (1996년 3월 14일 공개)에는 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 면역글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역에서 돌연변이를 유발하는 방법이 설명되어 있다. 다른 효과적인 방법은 비면역화 공여체로부터 얻은

천연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 사용하여 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 수회의 사슬 재서플링으로 보다 고친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 상기 기술을 통해 친화도가 약 10^{-9} M 이하인 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다.

[0890] 라이브리리의 스크리닝은 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 달성할 수 있다. 예를 들어, CD79b는 흡착 플레이트의 웰을 코팅하기 위해 사용하거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에 발현시키거나, 세포 분류에서 사용하거나, 스트렙타비딘-코팅된 비드로 포획하기 위해 비오틴에 접합하거나, 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 임의의 다른 방법에서 사용할 수 있다.

[0891] 파지 라이브러리 샘플을 파지 입자의 적어도 일부를 흡착제와 결합시키기 위해 적합한 조건 하에 고정된 CD79b와 접촉시킨다. 보통, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리학적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체상에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 설명된 바와 같이 산에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 설명된 바와 같이 알칼리에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법에 유사한 절차로 CD79b 항원 경쟁에 의해 용출시킨다. 파지는 단일 선택 라운드에서 20-1,000배 농축할 수 있다. 또한, 농축된 파지를 박테리아 배양액 내에서 성장시키고, 추가의 선택 라운드를 실행할 수 있다.

[0892] 선택의 효율은 세척 동안 해리 운동학, 및 단일 파지 상에서 다수 항체 단편이 항원과 동시에 결합할 수 있는지 여부를 포함한 많은 요인에 의해 결정된다. 빠른 해리 운동학 (및 약한 결합 친화도)을 갖는 항체는 짧은 세척, 다가 파지 디스플레이 및 고체상에서 높은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 보유시킬 수 있다. 고밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합에 유리하다. 느린 해리 운동학 (및 우수한 결합 친화도)을 갖는 항체의 선택은 문헌 [Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)]과 WO 92/09690에 설명된 바와 같이 오랜 세척 및 일가 파지 디스플레이, 및 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)]에 설명된 바와 같이 낮은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 촉진할 수 있다.

[0893] CD79b에 대한 상이한 친화도, 심지어 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체를 선택하는 것이 가능하다. 그러나, 선택된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어 일부 친화도 성숙 기술에서 수행된 바와 같이)는 대부분은 항원에 결합하고 몇몇은 보다 고친화도를 갖는 많은 돌연변이체를 초래하는 경향이 있다. CD79b를 제한하면, 희귀한 고친화도 파지가 경쟁에 의해 제거될 수 있다. 보다 고친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 파지를 과잉의 비오틴화 CD79b와 함께 인큐베이팅할 수 있지만, 비오틴화 CD79b는 CD79b에 대한 표적 물 친화도 상수보다 더 낮은 몰농도의 농도로 사용된다. 이어서, 고친화도 결합 파지를 스트렙타비딘-코팅된 상자성 (paramagnetic) 비드에 의해 포획할 수 있다. 그러한 "평형 포획"에 의해 항체를 그들의 결합 친화도에 따라 선택할 수 있고, 그의 감도로 인해 매우 과잉의 보다 낮은 친화도의 파지로부터 2배 더 높은 정도로 낮은 친화도를 갖는 돌연변이체 클론을 분리할 수 있다. 고체상에 결합된 파지를 세척하는데 사용되는 조건은 또한 해리 운동학을 기초로 하여 식별하도록 조작될 수 있다.

[0894] 항-CD79b 클론은 활성에 기초하여 선택할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 자연적으로 CD79b를 발현하는 살아있는 세포에 결합하는 항-CD79b 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 본 발명은 CD79b 리간드와 CD79b 사이의 결합을 차단하지만 CD79b 리간드와 제2 단백질 사이의 결합을 차단하지 않는 항-CD79b 항체를 제공한다. 그러한 항-CD79b 항체에 대응하는 Fv 클론은 (1) 상기 설명된 파지 라이브러리로부터 항-CD79b 클론을 분리하고, 임의로 파지 클론의 분리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) 각각 차단 및 비-차단 활성이 요망되는 CD79b 및 제2 단백질을 선택하고; (3) 항-CD79b 파지 클론을 고정된 CD79b에 흡착시키고; (4) 과잉의 제2 단백질을 사용하여 제2 단백질의 결합 결정자와 겹치고/겹치거나 공유하는 CD79b-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용출시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아 있는 클론을 용출시킴으로써 선택할 수 있다. 임의로, 목적하는 차단/비-차단 특성을 갖는 클론을 본원에 설명된 선택 절차를 1회 이상 반복함으로써 추가로 농축할 수 있다.

[0895] 본 발명의 하이브리도마-유래된 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 관심있는 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 분리되고 서열결정된다. 일단 분리한 후, DNA를 발현 벡터 내로 도입할 수 있고, 이어서 이를 재조합 숙주 세포 내에서 목적하는 모노클로날 항체를 합성하기 위해 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO)

세포, 또는 그렇지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염시킨다. 박테리아에서 항체-코딩 DNA의 재조합 발현에 관한 참조 문헌은 문헌 ([Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256 (1993)] 및 [Plueckthun, Immunol. Revs, 130:151 (1992)])을 포함한다.

[0896] 본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 문헌 [Kabat et al. 상기 문헌]으로부터 얻을 수 있다)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함한 임의의 이소형의 불변 영역을 상기 목적에 사용할 수 있고, 그러한 불변 영역은 임의의 인간 또는 동물종으로부터 얻을 수 있음이 이해될 것이다. 하나의 동물 (예를 들어 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후 다른 동물종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하ybrid" 전장 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 사용된 "키메라" 및 "하ybrid" 항체의 정의에 포함된다. 특정 실시태양에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론은 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 전장 또는 부분 길이의 인간 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성한다.

[0897] 하ybrid도마로부터 유래된 항-CD79b 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어, 하ybrid도마 클론으로부터 유래된 상동성 뮤린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형할 수 있다. 하ybrid도마- 또는 Fv 클론-유래된 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 연결시켜 추가로 변형할 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하ybrid도마 클론-유래된 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하ybrid" 항체를 제조한다.

[0898] C. 항체 의존 효소 매개 전구약물 요법 (ADEPT)

[0899] 본 발명의 항체는 또한 전구약물 (예를 들어, 펩티드 화학요법제, WO81/01145 참조)을 활성 항암 약물로 전환시키는 전구약물-활성화 효소에 항체를 접합함으로써 ADEPT에서 사용할 수 있다 (예를 들어, WO 88/07378 및 미국 특허 4,975,278 참조).

[0900] ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분은 전구약물을 그의 보다 활성인 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 전구약물에 대해 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.

[0901] 본 발명의 방법에 유용한 효소는 인산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 술페이트 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴술포타제; 무독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아 프로테아제, 테르몰리신, 셉틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텝신 (예를 들어, 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐 카르복시펩티다제; 글리코실화된 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들어 β -갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β -락타마제; 및 그들의 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸기 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페닐실린 아마이드제, 예를 들어 페닐실린 V 아마이드제 또는 페닐실린 G 아마이드제를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 별법으로, 본 발명의 전구약물을 유리 활성 약물로 전환시키기 위해 효소적 활성을 갖는 항체 (당업계에서 "아브자임 (abzyme)"으로도 알려짐)를 사용할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Massey, Nature 328:457-458 (1987)] 참조). 항체-아브자임 접합체는 종양 세포 집단에 아브자임을 전달하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.

[0902] 본 발명의 효소는 당업계에 잘 알려진 기술에 의해, 예를 들어 상기 논의된 이중2관능성 가교결합 시약을 사용하여 항-CD79b 항체에 공유결합시킬 수 있다. 별법으로, 적어도 본 발명의 효소의 기능적 활성 부분에 연결된 본 발명의 항체의 항원 결합 영역을 적어도 포함하는 융합 단백질은 당업계에 잘 알려진 재조합 DNA 기술을 이용하여 제작할 수 있다 (예를 들어, [Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)] 참조).

[0903] D. 항-CD79b 항체

[0904] 본원에 기재된 항-CD79b 항체에 추가로, 항-CD79b 항체 변이체를 제조할 수 있음이 고려된다. 항-CD79b 항체 변이체는 코딩 DNA에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입함으로써 및/또는 목적하는 항체 또는 폴리펩티드의 합성에 의해 제조할 수 있다. 당업자는 아미노산 변화가 항-CD79b 항체의 번역후 처리를 변경하고, 예를 들어 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키거나 막 앵커링 (anchoring) 특징을 변경시킬 수 있음을 알 것이다.

- [0905] 본원에 기재된 항-CD79b 항체에서 변이는 예를 들어, 미국 특허 5,364,934에 제시된 보존적 및 비-보존적 돌연 변이를 위한 임의의 기술 및 지침을 사용하여 형성시킬 수 있다. 변이는 천연 서열 항체 또는 폴리펩티드에 비해 아미노산 서열을 변화시키는, 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다. 임의로, 변이는 항-CD79b 항체의 하나 이상의 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 임의의 다른 아미노산으로 치환함에 의한다. 어느 아미노산 잔기가 목적하는 활성에 불리한 영향을 주지 않으면서 삽입, 치환 또는 결실될 수 있는지를 결정할 때의 지침은 목적하는 항-CD79b 항체의 서열을 공지의 상동성 단백질 분자의 서열과 비교하고 높은 상동성 영역에서 이루어지는 아미노산 서열 변화의 수를 최소화함으로써 밝혀질 수 있다. 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 교체하는, 예를 들어 류신을 세린으로 교체하는, 즉, 보존적 아미노산 교체의 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의로 약 1 내지 5개의 아미노산에 결실될 수 있다. 허용된 변이는 서열에서 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 체계적으로 만들고, 생성되는 변이체를 전장 또는 성숙 천연 서열이 보이는 활성에 대해 시험함으로써 결정할 수 있다.
- [0906] 항-CD79b 항체 단편을 본원에서 제공한다. 그러한 단편은 예를 들어 전장 천연 항체 또는 단백질과 비교할 때 N-말단 또는 C-말단에서 말단절단될 수 있거나 내부 잔기가 결여될 수 있다. 특정 단편은 항-CD79b 항체의 목적하는 생물학적 활성에 필수적이지 않은 아미노산 잔기가 결여된다.
- [0907] 항-CD79b 항체 단편은 임의의 많은 통상적인 기술에 의해 제조할 수 있다. 목적하는 펩티드 단편은 화학적으로 합성할 수 있다. 다른 방법은 효소에 의한 소화로 인해, 예를 들어 특정 아미노산 잔기에 의해 규정된 부위에서 단백질을 절단하는 것으로 알려진 효소로 단백질을 처리하거나 적합한 제한 효소로 DNA를 소화시킴으로써 항체 또는 폴리펩티드 단편을 생성하고, 목적하는 단편을 분리하는 것을 수반한다. 또다른 적합한 기술은 목적하는 항체 또는 폴리펩티드 단편을 코딩하는 DNA 단편을 분리하고 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭하는 것을 수반한다. DNA 단편의 목적하는 말단을 규정하는 올리고뉴클레오타이드를 PCR에서 5' 및 3' 프라이머에서 사용한다. 바람직하게는, 항-CD79b 항체 단편은 적어도 하나의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 본원에 개시된 천연 항-CD79b 항체와 공유한다.
- [0908] 특정 실시태양에서, 관심있는 보존적 치환을 표 8에 바람직한 치환의 표제 하에 제시한다. 그러한 치환이 생물학적 활성을 변화시키면, 하기 표 8에 예시적인 치환으로 명명하거나 아미노산 클래스에 대해 아래에 상세히 설명한 보다 실질적인 변화를 도입하고, 생성물을 스크리닝한다.

표 8

본래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
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;	
	노르류신	leu
Leu (L)	노르류신 ; 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; 노르류신	leu

- [0909]
- [0910] 항-CD79b 항체의 기능 또는 면역학적 실체의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선 입체형태로서의 치환 영역 내의 폴리펩티드 백본의 구조, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 대부분의 측쇄의 부피 (bulk)를 유지하는 것에 대한 그의 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 천연 발생 잔기는 공통적 측쇄 특성에 기초하여 다음 군으로 나누어진다:

- [0911] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;
- [0912] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;
- [0913] (3) 산성: asp, glu;
- [0914] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
- [0915] (5) 사슬 배향을 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및
- [0916] (6) 방향족: trp, tyr, phe.
- [0917] 비-보존적 치환은 이들 클래스의 하나의 멤버를 다른 클래스와 교환하는 것을 수반한다. 그러한 치환된 잔기를 또한 보존적 치환 부위 내로, 또는 보다 바람직하게는 나머지 (비-보존된) 부위 내로 도입할 수 있다.
- [0918] 변이는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드-매개 (부위 지정) 돌연변이 유발, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이 유발을 사용하여 이를 수 있다. 항-CD79b 항체 변이체 DNA를 생산하기 위해 클로닝된 DNA에 대해 부위 지정 돌연변이 유발 ([Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986)]; [Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)]), 카세트 돌연변이 유발 [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], 제한 선택 돌연변이 유발 [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] 또는 다른 공지 기술의 기술을 수행할 수 있다.
- [0919] 인접 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 확인하기 위해 스캐닝 아미노산 분석을 또한 사용할 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산에는 비교적 작은 중성 아미노산이 존재한다. 그러한 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린, 및 시스테인을 포함한다. 알라닌이 상기 군 중에서 대개 바람직한 스캐닝 아미노산이고, 그 이유는 알라닌이 베타-탄소를 지나서 존재하는 측쇄를 제거하고, 변이체의 주쇄 입체형태를 변경시킬 가능성이 작기 때문이다 [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. 알라닌은 또한 가장 흔한 아미노산이기 때문에 대개 바람직하다. 추가로, 알라닌은 종종 매립된 위치 및 노출된 위치 모두에서 발견된다 ([Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.)]; [Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]). 알라닌 치환이 적당량의 변이체를 생성하지 않을 경우에, 이소테릭 (isoteric) 아미노산을 사용할 수 있다.
- [0920] 항-CD79b 항체의 적합한 입체형태 유지에 관여하지 않은 임의의 시스테인 잔기도 또한 분자의 산화 안정성을 개선하고 이상 가교결합을 억제하기 위해 일반적으로 세린으로 치환시킬 수 있다. 이와 반대로, 그의 안정성 (특히 항체가 항체 단편, 예를 들어 Fv 단편인 경우)을 개선하기 위해, 시스테인 결합(들)을 항-CD79b 항체에 첨가할 수 있다.
- [0921] 특히 바람직한 종류의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기의 치환을 수반한다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선택된 생성되는 변이체(들)은 그들이 생성되는 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 그러한 치환 변이체를 생성하기 위한 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙을 수반한다. 간단히 설명하면, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어 6-7개의 부위)를 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하도록 돌연변이시킨다. 이렇게 생성된 항체 변이체를 각 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 필라멘트형 파지 입자로부터 일가 양식으로 디스플레이시킨다. 이어서 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그들의 생물학적 활성 (예를 들어 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인하도록 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발을 수행할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 항체와 CD79b 폴리펩티드 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 그러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기가 본원에서 설명된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가 개발을 위해 선택할 수 있다.
- [0922] 항-CD79b 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조한다. 이들 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 아미노산 서열 변이체의 경우에), 또는 미리 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 항-CD79b 항체의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위 지정) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발, 및 카세트 돌연변이 유발에 의한 제조를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0923] E. 항-CD79b 항체의 변형
- [0924] 항-CD79b 항체의 공유 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 하나의 종류의 공유 변형은 항-CD79b 항체의 표

적화된 아미노산 잔기를, 항-CD79b 항체의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시키는 것을 포함한다. 2관능성 물질을 사용한 유도체화는 예를 들어 항-CD79b 항체를 정제하기 위한 방법에서 사용하기 위한 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 항-CD79b 항체를 가교결합시키기 위해, 및 그 반대를 위해 유용하다. 일반적으로 사용되는 가교결합제는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산을 갖는 에스테르, 동종2관능성 이미도에스테르, 예를 들어 디숙신이미딜 에스테르, 예를 들어 3,3'-디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트), 2관능성 말레이미드, 예를 들어 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄 및 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 물질을 포함한다.

[0925] 다른 변형은 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 대응하는 글루타미닐 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 히드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 α-아미노기의 메틸화 [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카복실기의 아미드화를 포함한다.

[0926] 본 발명의 범위 내에 포함된 항-CD79b 항체의 다른 종류의 공유 변형은 항체 또는 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴의 변경을 포함한다. "천연 글리코실화 패턴의 변경"은 본원의 목적에서 천연 서열 항-CD79b 항체에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 삭제 (근원적인 글리코실화 부위의 제거에 의해 또는 화학적 및/또는 효소적 수단에 의한 글리코실화의 제거에 의해), 및/또는 천연 서열 항-CD79b 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 의미하고자 의도된다. 추가로, 상기 구문은 존재하는 다양한 탄수화물 모이어티의 특성 및 비율의 변화를 수반한, 천연 단백질의 글리코실화의 정성적 변화를 포함한다.

[0927] 항체 및 다른 폴리펩티드의 글리코실화는 대개 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결된 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티의 부착을 나타낸다. 트리펩티드 서열, 즉 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소에 의한 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에 이들 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 당, 즉 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중의 하나의 부착을 나타내지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신이 또한 사용될 수 있다.

[0928] 항-CD79b 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가는 하나 이상의 상기한 트리펩티드 서열을 갖도록 아미노산 서열을 변경함으로써 달성할 수 있다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 변경은 또한 본래의 항-CD79b 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 부가 또는 치환시켜 이를 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우). 항-CD79b 항체 아미노산 서열은 특히 목적하는 아미노산으로 번역될 코돈이 생성되도록 항-CD79b 항체를 코딩하는 DNA를 기선택된 염기에서 돌연변이시킴으로써, 임의로 DNA 수준에서 변화를 통해 변경시킬 수 있다.

[0929] 항-CD79b 항체 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 다른 수단은 폴리펩티드에 글리코시드를 화학적으로 또는 효소에 의해 커플링시키는 것이다. 그러한 방법은 예를 들어 1987년 9월 11일 공개된 WO 87/05330 및 문헌 [Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.* pp. 259-306 (1981)]에 기재되어 있다.

[0930] 항-CD79b 항체 상에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소에 의해, 또는 글리코실화의 표적으로 기능하는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈의 돌연변이에 의한 치환에 의해 달성할 수 있다. 화학적 탈글리코실화 기술은 당업계에서 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 ([Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)] 및 [Edge et al., *Anal. Biochem.* 118:131 (1981)])에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소에 의한 절단은 문헌 [Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987)]에 기재된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 달성할 수 있다.

[0931] 항-CD79b 항체의 다른 종류의 공유 변형은 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 제시된 방식으로 항체를 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중의 하나에 연결시키는 것을 포함한다. 항체는 또한 예를 들어 액적형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달체 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에 또는 마크로에멀전 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

- [0932] 본 발명의 항-CD79b 항체는 또한 다른 이중성 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 항-CD79b 항체를 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수 있다.
- [0933] 한 실시태양에서, 그러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 그에 대해 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 항-CD79b 항체의 융합체를 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 항-CD79b 항체의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치한다. 그러한 에피토프-태깅된 형태의 항-CD79b 항체의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 제공함으로써 항-태그 항체 또는 에피토프 태그에 결합하는 다른 종류의 친화도 매트릭스를 사용한 친화도 정제에 의해 항-CD79b 항체를 쉽게 정제할 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드와 그들의 각각의 항체는 당업계에 잘 알려져 있다. 그 예는 폴리-히스티딘 (poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (poly-his-gly) 태그; flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165 (1988)]; c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; 및 단순 포진 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]를 포함한다. 다른 태그 폴리펩티드는 Flag-펩티드 [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; KT3 에피토프 펩티드 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; α-튜블린 에피토프 펩티드 [Skinner et al., J. Biol. Chem. 266:15163-15166 (1991)]; 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]를 포함한다.
- [0934] 다른 실시태양에서, 키메라 분자는 면역글로불린 또는 면역글로불린의 특정 영역과 항-CD79b 항체의 융합체를 포함할 수 있다. 이가 형태의 키메라 분자 (본원에서 "면역어드헤신"으로도 칭함)에 대해, 상기 융합체는 IgG 분자의 Fc 영역에 대한 것일 수 있다. Ig 융합체는 바람직하게는 Ig 분자 내의 적어도 하나의 가변 영역 대신에 가용형 (막형단 도메인이 결실된 또는 불활성화된)의 항-CD79b 항체를 치환한 것을 포함한다. 특히 바람직한 실시태양에서, 면역글로불린 융합체는 힌지, IgG1 분자의 C_H2 및 C_H3, 또는 힌지, C_H1, C_H2 및 C_H3 영역을 포함한다. 면역글로불린 융합체의 생산에 대해서는 또한 미국 특허 5,428,130 (1995년 6월 27일 등록)을 참조한다.
- [0935] F. 항-CD79b 항체의 제조
- [0936] 아래의 상세한 설명은 주로 항-CD79b 항체-코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 세포의 배양에 의한 항-CD79b 항체의 생산에 관한 것이다. 물론, 항-CD79b 항체를 제조하기 위해 당업계에 잘 알려져 있는 다른 방법을 사용할 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열, 또는 그의 일부는 고체상 기술을 이용한 직접 펩티드 합성 (예를 들어, [Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)]; [Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)] 참조)에 의해 생산할 수 있다. 시험관내 단백질 합성은 수동 기술 또는 자동화 기술에 의해 수행할 수 있다. 자동화 합성은 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) 펩티드 합성기 (미국 캘리포니아주 포스터 시티)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 달성할 수 있다. 항-CD79b 항체의 다양한 부분들은 따로 화학적으로 합성하고, 목적하는 항-CD79b 항체를 생산하기 위해 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합할 수 있다.
- [0937] 1. 항-CD79b 항체를 코딩하는 DNA의 단리
- [0938] 항-CD79b 항체를 코딩하는 DNA는 항-CD79b 항체 mRNA를 갖고 이를 검출가능한 수준으로 발현하는 것을 생각되는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 따라서, 인간 항-CD79b 항체 DNA는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 얻을 수 있다. 항-CD79b 항체-코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 공지의 합성 절차 (예를 들어, 자동화 핵산 합성)에 의해 얻을 수 있다.
- [0939] 라이브러리는 관심있는 유전자 또는 그에 의해 코딩되는 단백질을 확인하도록 설계된 프로브 (예를 들어 적어도 약 20-80개 염기의 올리고뉴클레오타이드)를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 선택된 프로브를 사용한 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 스크리닝은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재된 바와 같은 표준 절차를 사용하여 수행할 수 있다. 항-CD79b 항체를 코딩하는 유전자를 단리하는 다른 수단은 PCR 방법을 사용하는 것이다 ([Sambrook et al., 상기 문헌]; [Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]).
- [0940] cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오타이드 서열은 충분한 길이이고 가양성이 최소화되도록 충분히 분명해야 한다. 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는

스크리닝되는 라이브러리 내의 DNA에의 혼성화시에 검출될 수 있도록 표지된다. 표지하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, ³²P-표지된 ATP와 같은 방사성 표지, 비오틴화 또는 효소 표지의 사용을 포함한다. 중등 엄격성 및 높은 엄격성을 포함한 혼성화 조건은 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 제공되어 있다.

[0941] 상기 라이브러리 스크리닝 방법에서 확인된 서열은 공공 데이터베이스, 예를 들어 GenBank 또는 다른 사실 서열 데이터베이스에 기탁되고 이로부터 이용가능한 다른 공지의 서열과 정렬되고 비교될 수 있다. 분자의 규정된 영역 내의 또는 전장 서열에 걸친 서열 동일성 (아미노산 또는 뉴클레오티드 수준에서)은 당업계에 공지되고 본원에 설명된 방법을 사용하여 결정할 수 있다.

[0942] 단백질 코딩 서열을 갖는 핵산은 처음으로 본원에 개시된 추정 아미노산 서열을 사용하고, 필요한 경우에 cDNA로 역전사될 수 없는 mRNA의 전구체 및 처리 중간체를 검출하기 위해 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 통상적인 프라이머 연장 절차를 이용하여 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻을 수 있다.

[0943] 2. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0944] 숙주 세포를 항-CD79b 항체 생산을 위해 본원에 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염 또는 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지 내에서 배양한다. 배양 조건, 예를 들어 배지, 온도, pH 등은 과도한 실험을 수행하지 않으면서 당업자가 선택할 수 있다. 일반적으로, 세포 배양액의 생산성을 최대화하기 위한 원칙, 프로토콜 및 실용적 기술은 문헌 ([Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)] 및 [Sambrook et al., 상기 문헌])에서 찾을 수 있다.

[0945] DNA가 염색체외로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 숙주 내로 DNA의 도입을 의미하는 진핵 세포 형질감염 및 원핵 세포 형질전환의 방법, 예를 들어 $CaCl_2$, $CaPO_4$, 리포솜-매개, 폴리에틸렌글리콜/DMSO 및 전기천공은 당업자에게 공지되어 있다. 사용된 숙주 세포에 따라, 형질전환은 상기 세포에 적절한 표준 기술을 사용하여 수행된다. 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리, 또는 전기천공은 일반적으로 원핵생물에 대해 사용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용한 감염은 문헌 ([Shaw et al., Gene, 23:315 (1983)] 및 1989년 6월 29일 공개된 WO 89/05859)에 기재된 바와 같은 특정 식물 세포의 형질전환을 위해 사용된다. 그러한 세포벽이 없는 포유동물 세포에 대해서는, 문헌 [Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전 방법을 사용할 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질감염의 일반적인 측면은 미국 특허 4,399,216에 기재되어 있다. 효모 내로 형질전환은 대개 문헌 ([Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977)] 및 [Hsiao et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)])의 방법에 따라 수행한다. 그러나, DNA를 세포 내로 도입하기 위한 다른 방법, 예를 들어 핵 미세주사, 전기천공, 무손상 세포와 박테리아 원형질체 융합, 또는 다가양이온, 예를 들어, 폴리브렌, 폴리오르니틴에 의한 방법도 또한 사용할 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환하기 위한 다양한 기술에 대해서는 문헌 ([Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)] 및 [Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)])을 참조한다.

[0946] 본원에서 벡터 내에서 DNA를 클로닝 또는 발현하기 위해 적합한 숙주 세포는 원핵, 효모, 또는 고등 진핵 세포를 포함한다.

[0947] a. 원핵생물 숙주 세포

[0948] 적합한 원핵생물은 원시박테리아 및 진정박테리아, 예를 들어 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세 (Enterobacteriaceae), 예를 들어 이. 콜라이를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다양한 이. 콜라이 균주, 예를 들어 이. 콜라이 K12 균주 MM294 (ATCC 31,446); 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537); 이. 콜라이 균주 W3110 (ATCC 27,325) 및 K5 772 (ATCC 53,635)가 공개적으로 이용가능하다. 다른 적합한 원핵생물 숙주 세포는 엔테로박테리아세, 예를 들어 에스케리치아 (*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터 (*Enterobacter*), 에르위니아 (*Erwinia*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 살모넬라 (*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피무름 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 (*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스 (*Serratia marcescans*) 및 시겔라 (*Shigella*), 및 바실러스 (*Bacilli*), 예를 들어 비. 섭틸리스 (*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스 (*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 예를 들어 피. 애틀루기노사 (*P. aeruginosa*), 리조비아 (*Rhizobia*), 비트레오실라 (*Vitreoscilla*), 파라코커스 (*Paracoccus*) 및 스트렙토마이

세스 (*Streptomyces*)를 포함한다. 이들 예는 제한적인 것이 아니라 예시적인 것이다. 균주 W3110은 재조합 DNA 생성물 발효를 위한 통상적인 숙주 균주이기 때문에 특히 바람직한 하나의 숙주 또는 모 숙주이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백 분해 효소를 분비한다. 예를 들어, 균주 W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC 기탁 번호 27,325)은 숙주에 내인성인 단백질을 코딩하는 유전자에 유전자 돌연변이를 발생시키도록 변형될 수 있고, 상기 숙주의 예는 완전한 유전형 tonA를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 1A2; 완전한 유전형 tonA ptr3을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 9E4; 완전한 유전형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 27C7 (ATCC 55,244); 완전한 유전형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 37D6; 비-카나마이신 내성 degP 결실 돌연변이가 존재하는 균주 37D6인 이. 콜라이 W3110 균주 40B4; 유전형 W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kan^r을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 33D3 (미국 특허 5,639,635) 및 1990년 8월 7일 등록된 미국 특허 4,946,783에 개시된 돌연변이체 주변 세포질 프로테아제를 갖는 이. 콜라이 균주를 포함한다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예를 들어 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이들 예는 제한적인 것이 아니라 예시적인 것이다. 규정된 유전형을 갖는 상기 언급된 박테리아의 유도체를 제작하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아의 세포 내에서 레플리콘의 복제가능성을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, 레플리콘을 제공하기 위해 잘 공지된 플라스미드, 예를 들어 pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410을 사용할 때 이. 콜라이, 세라티아, 또는 살모넬라 종을 숙주로서 적합하게 사용할 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백 분해 효소를 분비할 것이고, 추가의 프로테아제 억제제가 바람직하게는 세포 배양액 내에 포함될 수 있다. 별법으로, 시험관 내 클로닝 방법, 예를 들어, PCR 또는 다른 핵산 증폭효소 반응이 적합하다.

[0949]

전장 항체, 항체 단편, 및 항체 융합체 단백질을 특히 글리코실화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않을 때, 예를 들어 치료 항체가 세포독성제 (예를 들어, 독소)에 접합되고 면역접합체 자체가 종양 세포 파괴에 유효성을 보일 때 박테리아에서 생산할 수 있다. 전장 항체는 순환 반감기가 보다 길다. 이. 콜라이 내에서의 생산은 보다 빠르고 보다 비용 효율적이다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는 예를 들어 U.S. 5,648,237 (Carter et. al), U.S. 5,789,199 (Joly et al.), 및 발현 및 분비의 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열을 설명하는 U.S. 5,840,523 (Simmons et al.) (이들 특허는 본원에 참고로 포함된다)을 참조한다. 발현 후에, 항체는 가용형 분획 내의 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 단리하고, 예를 들어 이소형에 따라 단백질 A 또는 G 컬럼을 통해 정제할 수 있다. 최종 정제는 예를 들어, CHO 세포 내에서 발현된 항체를 정제하기 위한 방법과 유사하게 수행할 수 있다.

[0950]

b. 진핵생물 숙주 세포

[0951]

원핵생물에 추가로, 진핵 미생물, 예를 들어 필라멘트형 진균 또는 효모가 항-CD79b 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비시아에 (*Saccharomyces cerevisiae*)는 흔히 사용되는 저등 진핵 숙주 미생물이다. 다른 숙주는 쉬조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985년 5월 2일 공개된 EP 139,383); 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 숙주 (미국 특허 4,943,529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)), 예를 들어, 케이. 락티스 (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol. 154(2):737-742 [1983]), 케이. 프라길리스 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위커라미 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티 (*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸 (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), 케이. 테르모톨러란스 (*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28:265-278 [1988]); 칸디다 (*Candida*); 트리코데르마 레에시아 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*) (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); 슈바니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 슈바니오마이세스 옥시덴탈리스 (*Schwanniomyces occidentalis*) (1990년 10월 31일 공개된 EP 394,538); 및 필라멘트형 진균, 예를 들어, 뉴로스포라, 페니실리움 (*Penicillium*), 톨리포클라디움 (*Tolypocladium*) (1991년 1월 10일 공개된 WO 91/00357), 및 아스퍼질러스 (*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 에이. 니들란스 (*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]) 및 에이. 니거 (*A. niger*) (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985])를 포함한다. 메탄올 자화 (methylophilic) 효모가 본원에서 적합하고, 한세누라 (*Hansenula*), 칸디다, 클로에케라 (*Kloeckera*), 피키아, 사카로마이세스, 토룰로시스 (*Torulopsis*) 및 로도토룰라 (*Rhodotorula*)로 구성된 속으로부터 선택된, 메탄올에서 성장할 수 있는 효모를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 상기 효모 클래스의 예시적인 특정 종은 문헌 [C. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269 (1982)]에 제시되어 있다.

[0952] 클리코실화된 항-CD79b 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 곤충 세포, 예를 들어 드로소필라 (*Drosophila*) S2 및 스포도테라 (*Spodoptera*) Sf9, 및 식물 세포, 예를 들어 면화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 세포 배양액을 포함한다. 많은 바칼로바이러스 군주 및 변이체, 및 숙주, 예를 들어 스포도테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*; 썩기벌레), 아에데스 아에지티 (*Aedes aegypti*, 모기), 아에데스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*, 모기), 드로소필라 멜라노가스터 (*Drosophila melanogaster*, 과일파리), 및 봄빅스 모리 (*Bombyx mori*)로부터의 대응하는 허용성 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 군주, 예를 들어 오토그라파 칼리포르니카 (*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체, 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 군주가 공개적으로 이용가능하고, 그러한 바이러스는 특히 스포도테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로서 사용할 수 있다.

[0953] 그러나, 척추동물 세포에 가장 큰 관심을 기울여 왔고, 배양액 (조직 배양액)에서 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장주 (293 세포 또는 현탁 배양으로 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1997)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/DHFR (CHO, [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 초록 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암세포주 (Hep G2)이다.

[0954] 숙주 세포를 항-CD79b 항체 생산을 위한 상기한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지 내에서 배양한다.

[0955] 3. 복제가능 벡터의 선택 및 사용

[0956] 본 발명의 항체의 재조합 생산을 위해, 그를 코딩하는 핵산 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)를 분리하고, 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능 벡터 내로 삽입시킨다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 쉽게 분리되고 서열결정된다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써). 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로 사용할 숙주 세포에 따라 결정된다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 (일반적으로 포유동물) 기원의 것이다.

[0957] 벡터는 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자, 또는 파지 형태로 존재할 수 있다. 적절한 핵산 서열은 다양한 절차에 의해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내로 삽입된다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 하나 이상의 이들 성분을 포함하는 적합한 벡터의 제작에는 당업자에게 공지된 표준 라이게이션 기술을 이용한다.

[0958] CD79b는 직접적으로, 및 또한 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드일 수 있는 이중성 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합 방식으로 생산할 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내로 삽입되는 항-CD79b 항체-코딩 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열안정성 엔테로톡신 II 리더의 군 중에서 선택된 원핵생물 신호 서열일 수 있다. 효모 분비를 위해, 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, 알파 팩터 리더 (사카로마이세스 α -팩터 리더 및 미국 특허 5,010,182에 기재된 클루이베로마이세스 α -팩터 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, 썬. 알비칸스 (*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더 (1990년 4월 4일

공개된 EP 362,179) 또는 1990년 11월 15일 공개된 WO 90/13646에 기재된 신호일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 단백질의 분비를 지시하기 위해 포유동물 신호 서열, 예를 들어 동일한 또는 관련 종의 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열 및 바이러스 분비 리더를 사용할 수 있다.

[0959]

a. 원핵생물 숙주 세포

[0960]

본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체 생산 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포로부터 단리하고 서열 결정할 수 있다. 별법으로, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵생물 숙주에서 이중성 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가 가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적을 위해 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터 내로 삽입되는 핵산의 크기, 및 벡터로 형질전환시킬 특정 숙주 세포에 따라 결정될 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이중성 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라, 다양한 성분을 포함한다.

[0961]

일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 포함하는 플라스미드 벡터를 이들 숙주에 대해 사용한다. 발현 및 클로닝 벡터는 모두 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제하도록 하는 핵산 서열, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 (marking) 서열을 포함한다. 그러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 잘 알려져 있다. 암피실린 (Amp) 및 테트라사이클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 포함하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공하는 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점이 대부분의 그람-음성 박테리아에 대해 적합하고, 2 μ 플라스미드 기점이 효모에 대해 적합하고, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)이 포유동물 세포에서 클로닝 벡터에 대해 유용하다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지는 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 이들 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 미국 특허 5,648,237 (Carter et al.)에 상세하게 기재되어 있다.

[0962]

추가로, 이들 숙주에 관하여 형질전환 벡터로서 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 조절 서열을 포함하는 파지 벡터를 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포를 형질전환하기 위해 사용할 수 있는 재조합 벡터를 제조하기 위해 예를 들어 λ GEM.TM.-11을 사용할 수 있다.

[0963]

본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2개 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상류 (5')에 위치하는 비번역된 조절 서열이다. 원핵생물 프로모터는 대개 2개의 클래스, 즉, 유도가능 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도가능 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어 하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

[0964]

다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 매우 많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고, 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시하기 위해 천연 프로모터 서열 및 많은 이중성 프로모터를 모두 사용할 수 있다. 일부 실시태양에서, 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 고수율을 가능하게 하므로, 이중성 프로모터가 이용된다.

[0965]

다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 잘 알려져 있다. 원핵생물 숙주와 함께 사용하기 위해 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템 ([Chang et al., Nature, 275:615 (1978)]; [Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)]), 알칼리성 포스파타제, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 ([Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)]; EP 36,776), 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] 또는 trc 프로모터를 포함한다. 박테리아 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 항-CD79b 항체를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (Shine-Dalgarno; S.D.) 서열을 포함할 것이다. 그러나, 박테리아에서 기능하는 다른 프로모터 (예를 들어 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)도 또한 적합하다. 그들의 뉴클레오타이드 서열은 공개되어 있고, 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하도록 링커 또는 어댑터를 사용하여 이들 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이팅할 수 있다 (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269).

- [0966] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 막을 가로지른 발현된 폴리펩티드의 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 벡터 내로 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이중성 폴리펩티드에 천연적인 신호 서열을 인식하고 프로세싱하지 않는 원핵생물 숙주 세포에 대해, 신호 서열은 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어지는 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열에 의해 치환된다. 본 발명의 한 실시태양에서, 발현 시스템의 두 시스트론 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.
- [0967] 다른 측면에서, 본 발명에 따른 면역글로불린의 생산은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있고, 따라서 각각의 시스트론 내에 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 면역글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 접히고, 조립되어 세포질 내에서 기능적 면역글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 trxB⁻ 균주)는 디설피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공하여, 발현된 단백질 서브유닛의 적합한 폴딩 및 조립을 허용한다 (Proba and Plueckthun, Gene, 159:203 (1995)).
- [0968] 본 발명은 발현된 폴리펩티드 성분의 정량적 비율이 분비되고 적절하게 조립된 항체의 수율을 최대화하도록 조정될 수 있는 발현 시스템을 제공한다. 그러한 조정은 적어도 부분적으로 폴리펩티드 성분에 대한 번역 강도의 동시 조절에 의해 달성된다.
- [0969] 번역 강도를 조절하기 위한 하나의 기술은 미국 특허 5,840,523 (Simmons et al.)에 개시되어 있다. 상기 기술에서는 시스트론 내에서 번역 개시 영역 (TIR)의 변이체를 이용한다. 주어진 TIR에 대해, 일정 범위의 번역 강도를 갖는 일련의 아미노산 또는 핵산 서열 변이체가 생성될 수 있어서, 상기 인자를 특정 사슬의 목적하는 발현 수준을 위해 조정하는 편리한 수단을 제공한다. TIR 변이체는 아미노산 서열을 변경할 수 있는 코돈 변화를 초래하는 통상적인 돌연변이 유발 기술에 의해 생성할 수 있지만, 뉴클레오타이드 서열에서 침묵 변화가 바람직하다. TIR에서 변경은 예를 들어 신호 서열의 변경과 함께, 샤페론-달가노 서열의 수 또는 간격의 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이체 신호 서열을 생성하는 하나의 방법은 신호 서열의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 (즉, 변화가 침묵인) 코딩 서열의 시작점에서의 "코돈 뱅크 (codon bank)"의 생성이다. 이것은 각각의 코돈의 제3 뉴클레오타이드 위치를 변화시켜 달성할 수 있고; 추가로 류신, 세린 및 아르기닌과 같은 일부 아미노산은 상기 뱅크를 제조하는데 있어서 복잡성을 추가할 수 있는 다수의 제1 및 제2 위치를 갖는다. 상기 돌연변이 유발의 방법은 문헌 [Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158]에 상세히 기재되어 있다.
- [0970] 바람직하게는, 그 안의 각각의 시스트론에 대한 일정 범위의 TIR 강도를 갖는 벡터의 세트를 생성시킨다. 상기 제한된 세트는 각각의 사슬의 발현 수준의 비교 및 다양한 TIR 강도 조합 하에 목적하는 항체 생성물의 수율의 비교를 제공한다. TIR 강도는 미국 특허 5,840,523 (Simmons et al.)에 상세히 기재된 바와 같이 리포터 유전자의 발현 수준을 정량화함으로써 결정할 수 있다. 번역 강도 비교에 기초하여, 본 발명의 발현 벡터 구성체 내에 조합되도록 목적하는 개별 TIR을 선택한다.
- [0971] b. 진핵생물 숙주 세포
- [0972] 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0973] (1) 신호 서열 성분
- [0974] 진핵생물 숙주 세포에서 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심있는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 선택되는 이중성 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.
- [0975] 그러한 전구체 영역에 대한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 관독 프레임 내에 라이게이팅된다.
- [0976] (2) 복제 기점
- [0977] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점은 단지 조기 프로모터를 포함하기 때문에 일반적으로 사용될 수 있다

- [0978] (3) 선택 유전자 성분
- [0979] 발현 및 클로닝 벡터는 대개 선택가능 마커로도 불리는 선택 유전자를 포함할 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트, 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실러스 (Bacilli)에 대한 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.
- [0980] 선택 방식의 한 예에서는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중성 유전자로 성공적으로 형질 전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 요법에서 생존한다. 그러한 우성 선택의 예에서는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 하이그로마이신을 이용한다.
- [0981] 포유동물 세포에 적합한 선택가능 마커의 예는 항-CD79b 항체-코딩 핵산을 흡수하는 능력을 갖는 세포의 확인을 가능하게 하는 것, 예를 들어 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다. 야생형 DHFR을 사용할 때 적절한 숙주 세포는 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)]에 기재된 바와 같이 제조하고 번식시킨 DHFR 활성이 결여된 CHO 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다. 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질 전환된 세포는 먼저 모든 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 별법으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 또다른 선택가능 마커, 예를 들어 아미노글리코사이드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 동시-형질전환된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선택가능 마커에 대한 선택제, 예를 들어 아미노글리코사이드계 항생제, 예를 들어, 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418를 함유하는 배지 내에서 세포 성장에 의해 선택할 수 있다 (미국 특허 4,965,199 참조).
- [0982] 효모에서 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 ([Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)]; [Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979)]; [Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]). trp1 유전자는 트립토판 내에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].
- [0983] (4) 프로모터 성분
- [0984] 발현 및 클로닝 벡터는 대체로 mRNA 합성을 지시하도록 항-CD79b 항체-코딩 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 잘 알려져 있다.
- [0985] 실질적으로 모든 진핵생물 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 약 25 내지 30 염기 상류에 위치하는 AT 풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 개시점으로부터 70 내지 80 염기 상류에서 발견되는 다른 서열은 CNCAAT 영역이고, 여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. 대부분의 진핵생물 유전자의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일을 첨가하기 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 이들 서열은 모두 진핵생물 발현 벡터에 적합하게 삽입된다.
- [0986] 효모 숙주와 함께 사용하기 위해 적합한 프로모팅 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 또는 다른 당분해 효소 ([Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)]; [Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]), 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제를 위한 프로모터를 포함한다.
- [0987] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 잇점을 갖는 유도가능 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사에 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스와 갈락토스 이용을 담당하는 효소를 위한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기 위해 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다.
- [0988] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터 항-CD79b 항체 전사는 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성이라면, 폴리 오마 바이러스, 조류폭스 바이러스 (1989년 7월 5일 공개된 UK 2,211,504), 아데노바이러스 (예를 들어 아데노 바이러스 2), 소 파필로마 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 계놈으로부터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 및 열 충격 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 제어된다.

- [0989] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 포함하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 인간 사이토메갈로바이러스의 최조기 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 벡터로서 소 파필로마 바이러스를 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템은 미국 특허 4,419,446에 개시되어 있다. 상기 시스템의 변형이 미국 특허 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA의 발현에 대해서는 또한 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 별법으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복체가 프로모터로서 사용될 수 있다.
- [0990] (5) 인핸서 요소 성분
- [0991] 고등 진핵생물에 의한 항-CD79b 항체를 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가시킬 수 있다. 인핸서는 그의 전사를 증가시키도록 프로모터에 대해 작용하는, 대체로 약 10 내지 300 bp인 DNA의 시스 작용 (cis-acting) 요소이다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -페토단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 대개 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 그 예는 복제 기점의 하류 쪽의 SV40 인핸서 (bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵생물 프로모터의 활성화를 위한 향상 요소에 대해서는 또한 문헌 [Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 위치 5' 또는 3'에서 항-CD79b 항체 코딩 서열까지 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.
- [0992] (6) 전사 종결 성분
- [0993] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 (nucleated) 세포)에 사용되는 발현 벡터도 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 포함할 것이다. 그러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항-CD79b 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분 내의 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 세그먼트를 포함한다. 하나의 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다 (W094/11026과 그에 개시된 발현 벡터 참조).
- [0994] 재조합 척추동물 세포 배양액에서 항-CD79b 항체의 합성에 채용하기 적합한 또다른 방법, 벡터, 및 숙주 세포는 문헌 ([Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)]; [Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)]; EP 117,060; 및 EP 117,058)에 기재되어 있다.
- [0995] 4. 숙주 세포의 배양
- [0996] 본 발명의 항-CD79b 항체를 생산하기 위해 사용된 숙주 세포는 다양한 배지 내에서 배양할 수 있다.
- [0997] a. 원핵생물 숙주 세포
- [0998] 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위해 사용된 원핵 세포는 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지 내에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 필수 영양 보충물을 첨가한 루리아 (luria) 육즙 (LB)를 포함한다. 일부 실시태양에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선택제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위한 배지에 첨가된다.
- [0999] 탄소, 질소 및 무기 인산염 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이 또한, 단독으로 또는 복합 질소원과 같은 다른 보충물 또는 배지와 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타민, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트ρί톨 및 디티오트레이톨로 이루어지는 군 중에서 선택된 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다.
- [1000] 원핵생물 숙주 세포는 적합한 온도에서 배양된다. 이. 콜라이의 성장을 위해, 예를 들어 바람직한 온도는 약 20°C 내지 약 39°C, 보다 바람직하게는 약 25°C 내지 약 37°C, 훨씬 더 바람직하게는 약 30°C 범위이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이에 대해, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 더욱 바람직하게는 약 7.0이다.
- [1001] 유도가능 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사를 제어하기 위해 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지 내에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한

배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이 사용된 벡터 구성체에 따라 다양한 다른 인두서가 사용될 수 있다.

[1002]

한 실시태양에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 주변세포질 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 단백질을 회수는 대개, 일반적으로 삼투압 충격, 초음파처리 또는 분해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 일단 세포가 분쇄되면, 세포 파편 또는 전체 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질을 예를 들어, 친화도 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 별법으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 분리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상등액을 여과하고 농축하여 생산된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 분리하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 (Western blot) 분석과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.

[1003]

본 발명의 한 측면에서, 항체 생산은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 (fed-batch) 발효 절차가 재조합 단백질의 생산에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 이들 발효기는 산소 및 영양물, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지원)를 분배하기 위해 교반기 추진기 (impeller)를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로 부피 용량으로 대략 100 리터 이하인 발효기에서 발효를 나타내고, 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[1004]

발효 공정에서, 단백질 발현의 유도는 대개 세포를 적합한 조건 하에 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180-220의 OD₅₅₀으로 성장시킨 후에 개시되고, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구성체에 따라 다양한 인두서를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 대체로 약 12-50시간 동안 유도시키지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.

[1005]

본 발명의 폴리펩티드의 생산 수율 및 품질을 개선하기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비형 항체 폴리펩티드의 적합한 조립 및 폴딩을 개선하기 위해, 샤페론 (chaperone) 단백질, 예를 들어 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 갖는 펩티딜프롤릴 시스,트랜스-이소머라제)를 과다발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵 세포를 동시에 형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생산된 이중성 단백질의 적합한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다 ([Chen et al. (1999) J Bio Chem. 274:19601-19605]; 미국 특허 6,083,715 (Georgiou et al.); 미국 특허 6,027,888 (Georgiou et al.); [Bothmann and Plueckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105]; [Ramm and Plueckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210]).

[1006]

발현된 이중성 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주는 공지의 박테리아 프로테아제, 예를 들어 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 이들의 조합을 코딩하는 유전자 내에서 유전자 돌연변이(들)를 수행하도록 변형될 수 있다. 일부 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하고, 예를 들어 문헌 ([Joly et al. (1998), 상기 문헌]; 미국 특허 5,264,365 (Georgiou et al.); 미국 특허 5,508,192 (Georgiou et al.); [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)])에 기재되어 있다.

[1007]

한 실시태양에서, 단백질 분해 효소가 결핍되고 하나 이상의 샤페론 단백질을 과다발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로서 사용된다.

[1008]

b. 진핵생물 숙주 세포

[1009]

상업적으로 이용가능한 배지, 예를 들어 햄 (Ham's) F10 (시그마 (Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마), 및 둘베코 (Dulbecco's) 개질 이글 (Eagle's) 배지 (DMEM, 시그마)가 숙주 세포를 배양하기 위해 적합하다. 추가로, 문헌 ([Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:225 (1980)]), 미국 특허 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 설명된 임의의 배지를 숙주 세포에 대한 배양 배지로서 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 버퍼 (예를 들어 HEPES), 뉴클레오타이드 (예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예를 들어, GENTAMYCINTM 약물), 미량 원소 (대체로 마이크로물 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 동등 에너지원으로 보충할 수

있다. 임의의 다른 필수 보충물을 또한 당업자에게 알려진 적절한 농도로 포함시킬 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[1010] 5. 유전자 증폭/발현의 검출

[1011] 유전자 증폭 및/또는 발현은 예를 들어, 본원에 제공된 서열에 기초하여, mRNA의 전사를 정량하는 통상적인 서던 블로팅, 노던 블로팅 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205 (1980)], 도트 블로팅 (DNA 분석), 또는 적절하게 표지된 프로브를 사용한 계내 혼성화에 의해 샘플 내에서 직접 측정할 수 있다. 별법으로, DNA 이중체, RNA 이중체, 및 DNA-RNA 하이브리드 이중체 또는 DNA-단백질 이중체를 포함한 특이적 이중체를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 다시 항체는 표지될 수 있고, 표면 상에서 이중체의 형성시에 이중체에 결합된 항체의 존재를 검출할 수 있도록 이중체가 표면에 결합되어 분석이 수행될 수 있다.

[1012] 별법으로, 유전자 발현은 면역학적 방법, 예를 들어 세포 또는 조직 절편의 면역조직화학 염색, 및 유전자 생성물의 발현을 직접 정량하기 위해 세포 배양액 또는 체액의 분석에 의해 측정할 수 있다. 면역조직화학 염색 및/또는 샘플 유체의 분석에 유용한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있고, 임의의 포유동물에서 제조할 수 있다. 편리하게는, 항체는 천연 서열 CD79b 폴리펩티드에 대하여, 또는 본원에 제공된 DNA 서열에 기반한 합성 펩티드에 대하여, 또는 CD79b DNA에 융합되고 특이적 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대하여 제조할 수 있다.

[1013] 6. 항-CD79b 항체의 정제

[1014] 항-CD79b 항체의 형태는 배양 배지 또는 숙주 세포 용해물로부터 회수할 수 있다. 막 결합형인 경우에는, 항체는 적합한 세제 용액 (예를 들어 Triton-X 100)을 사용하여 또는 효소에 의한 절단에 의해 막으로부터 방출시킬 수 있다. 항-CD79b 항체의 발현에 사용되는 세포는 다양한 물리적 또는 화학적 수단, 예를 들어 동결-해동 순환, 초음파 처리, 기계적 파괴, 또는 세포용해제에 의해 파괴할 수 있다.

[1015] 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 항-CD79b 항체를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 다음 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 이온-교환 컬럼 상의 분획화; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예를 들어 DEAE 상의 크로마토그래피; 크로마토포커싱 (chromatofocusing); SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들어, 세파텍스 G-75를 사용한 겔 여과; 오염물, 예를 들어 IgG를 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 컬럼; 및 항-CD79b 항체의 에피토프-태깅된 형태에 결합하는 금속 킬레이팅 컬럼. 단백질 정제의 다양한 방법을 사용할 수 있고, 그러한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)]에 기재되어 있다. 선택된 정제 단계(들)은 예를 들어 사용된 생산 공정의 특성, 및 생산된 특정 항-CD79b 항체에 따라 결정될 것이다.

[1016] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서, 주변 세포질 공간 내에서 생산되거나 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되면, 제1 단계로서, 입자형 파편인 숙주 세포 또는 용해된 단편은 예를 들어 원심분리 또는 초여과 (ultrafiltration)에 의해 제거된다. 문헌 [Carter et al. Bio/Technology 10: 163-167 (1992)]에서는 이. 콜라이의 주변 세포질 공간에 분비된 항체를 단리하기 위한 절차가 설명되어 있다. 간단히 설명하면, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에, 그러한 발현 시스템으로부터의 상등액을 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 유닛을 사용하여 농축시킨다. 단백 분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF가 임의의 선행 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[1017] 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화도 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화도 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 의해 좌우된다. 단백질 A가 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기초로 한 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (Lindmark et al. J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다 (Guss et al. EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 종종 아가로스로이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들어 제어진 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠이 아가로스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유동 속도와 더 짧은 처리 시간

을 허용한다. 항체가 C₄3 도메인을 포함하는 경우에, Bakerbond ABX™ 수지 (제이.티. 베이커 (J.T. Baker, 미국 뉴저지주 필립스버그))가 정제를 위해 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 해파린 SEPHAROSE™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 회수할 항체에 따라 이용가능하다.

[1018] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 목적하는 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 pH가 약 2.5-4.5인 용출 버퍼를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

[1019] G. 제약 제제

[1020] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 치료할 병태에 적절한 임의의 경로로 투여할 수 있다. ADC는 대개 비경구로, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 피부내, 경막내 및 경막외로 투여될 것이다.

[1021] 이들 암을 치료하기 위해, 한 실시태양에서, 항체-약물 접합체는 정맥내 주입을 통해 투여된다. 주입을 통해 투여되는 투여량은 용량당 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 10,000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이고, 일반적으로 총 1, 2, 3 또는 4회 용량을 위해 1주당 1회 투여한다. 별법으로, 투여량 범위는 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 및 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 용량은 1일 1회, 1주 1회, 1주 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1주 1회 미만, 1개월 1회로 투여되거나, 또는 질병의 증상을 경감 또는 완화시키기 위해 간헐적으로 투여될 수 있다. 투여는 치료되는 림프종, 백혈병의 종양 또는 증상의 완화시까지 임의의 개시된 간격으로 계속될 수 있다. 증상의 완화 또는 경감이 계속된 투여에 의해 연장되는 경우에는 증상의 완화 또는 경감이 달성된 후에도 투여가 계속될 수 있다.

[1022] 본 발명은 또한 자가면역 질병에 걸린 환자에게 치료 유효량의 임의의 하나의 선행 실시태양의 인간화 MA79b 항체-약물 접합체를 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질병의 완화 방법을 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 정맥내 또는 피하 투여한다. 항체-약물 접합체는 용량당 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 100 mg/m^2 의 투여량으로 정맥내로 투여되고, 특정 실시태양에서, 투여량은 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 용량은 1일 1회, 1주 1회, 1주 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1주 1회 미만, 1개월 1회로 투여되거나, 또는 질병의 증상을 경감 또는 완화시키기 위해 간헐적으로 투여될 수 있다. 투여는 치료되는 자가면역 질병의 증상의 경감 또는 완화시까지 임의의 개시된 간격으로 계속될 수 있다. 증상의 완화 또는 경감이 계속된 투여에 의해 연장되는 경우에는 증상의 완화 또는 경감이 달성된 후에도 투여가 계속될 수 있다.

[1023] 본 발명은 또한 B 세포 질환, 예를 들어 B 세포 증식성 장애 (비제한적으로 림프종 및 백혈병 포함) 또는 자가면역 질병으로 고통받는 환자에게, 세포독성 분자 또는 검출가능한 분자에 접합되지 않은 임의의 하나의 선행 실시태양의 인간화 MA79b 항체의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, B 세포 질환의 치료 방법을 제공한다. 항체는 대개 약 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 1000 mg/m^2 의 투여량 범위로 투여될 것이다.

[1024] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 항-CD79b 항체 및/또는 적어도 하나의 그의 면역접합체 및/또는 본 발명의 적어도 하나의 항-CD79b 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 제제를 추가로 제공한다. 일부 실시태양에서, 제약 제제는 (1) 본 발명의 항체 및/또는 그의 면역접합체, 및 (2) 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 일부 실시태양에서, 제약 제제는 (1) 본 발명의 항체 및/또는 그의 면역접합체, 및 임의로 (2) 적어도 하나의 추가의 치료제를 포함한다. 추가의 치료제는 아래 설명된 것을 포함하고 이로 제한되지 않는다. ADC는 대개 비경구로, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 피부내, 경막내 및 경막외로 투여될 것이다.

[1025] 본 발명에 따라 사용되는 항-CD79b 항체 또는 CD79b 면역접합체를 포함하는 치료 제제는 목적하는 순도를 갖는 항체 또는 항체-약물 접합체를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합하여 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장을 위해 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 버퍼, 예를 들어 아세트이트, Tris, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 황산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메

틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 등장제, 예를 들어 트레할로스 및 염화나트륨; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트; 염-형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN®, PLURONICS® 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 생체내 투여에 사용할 제약 제제는 일반적으로 멸균성이다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[1026] 본원의 제제는 또한 치료할 특정 적응증에 필요하면 하나 초과와 활성 화합물, 바람직하게는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항-CD79b 항체에 추가로, 하나의 제제 내에, 추가의 항체, 예를 들어, CD79b 폴리펩티드 상의 상이한 에피토프에 결합하는 제2 항-CD79b 항체, 또는 특정 암의 성장에 영향을 미치는 성장 인자와 같은 일부 다른 표적에 대한 항체를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 조성물은 화학요법제, 세포독성제, 시토킨, 성장 억제제, 항-호르몬제, 및/또는 심장보호제를 추가로 포함할 수 있다. 그러한 분자는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합물 내에 존재한다.

[1027] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달체 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에 또는 마크로에멀전 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[1028] 지속 방출 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT® (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능 미세구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예를 들어 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 봉입된 면역글로불린이 장기간 동안 체내에 남아있을 때, 이들은 37°C에서 습기에 노출된 결과로서 변성 또는 응집되어 생물학적 활성의 상실 및 가능하게는 면역원성의 변화가 일어날 수 있다. 관련된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는 술폰히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.

[1029] 항체는 표적 세포/조직으로 전달을 위해 임의의 적합한 형태로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 항체는 면역리포솜으로서 제제화될 수 있다. "리포솜"은 약물을 포유동물에게 전달하기 위해 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 리포솜의 성분들은 통상적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 2층 구조로 배열된다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌 ([Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980)]; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545; 및 1997년 10월 23일 공개된 W097/38731)에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 향상된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 5,013,556에 개시되어 있다.

[1030] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 생성할 수 있다. 리포솜은 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득하도록 규정된 공극 크기의 필터를 통해 압출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설피드 상호교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 접합체팅할 수 있다. 화학요법제는 임의로 리포솜 내에 함유된다 ([Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)] 참조).

[1031] 생체내 투여에 사용할 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

- [1032] H. 항-CD79b 항체를 사용한 치료
- [1033] 암에서 CD79b 발현을 결정하기 위해, 다양한 검출 분석이 이용가능하다. 한 실시태양에서, CD79b 폴리펩티드 과다발현은 면역조직화학 (IHC)에 의해 분석할 수 있다. 종양 생검물로부터 파라핀 포매 조직 절편을 IHC 분석에 적용하고, 다음과 같이 CD79b 단백질 염색 강도 기준을 부여할 수 있다:
- [1034] 스코어 0 - 염색이 관찰되지 않거나, 10% 미만의 종양 세포에서 막 염색이 관찰된다.
- [1035] 스코어 1+ - 희미한/거의 지각할 수 없는 막 염색이 10% 초과와 종양 세포에서 검출된다. 세포는 단지 그의 막의 일부에서만 염색된다.
- [1036] 스코어 2+ - 약한 내지 중정도의 완전한 막 염색이 10% 초과와 종양 세포에서 관찰된다.
- [1037] 스코어 3+ - 중정도 내지 강한 정도의 완전한 막 염색이 10% 초과와 종양 세포에서 관찰된다.
- [1038] CD79b 폴리펩티드 발현에 대해 0 또는 1+ 스코어를 갖는 종양은 CD79b를 과다발현하지 않는 것으로 특성 결정될 수 있는 반면, 2+ 또는 3+ 스코어를 갖는 종양은 CD79b를 과다발현하는 것으로 특성 결정될 수 있다.
- [1039] 별법으로 또는 추가로, 종양에서 CD79b 과다발현 (존재하는 경우)의 정도를 결정하기 위해 FISH 분석, 예를 들어 INFORM® (벤탐나 (Ventana, 미국 아리조나주)에서 시판) 또는 PATHVISION® (비시스 (Vysis, 미국 일리노이주))을 포르말린-고정되고 파라핀-포매된 종양 조직에 대해 수행할 수 있다.
- [1040] CD79b 과다발현 또는 증폭은 예를 들어 검출할 분자에 결합하고 검출가능한 표지 (예를 들어, 방사성 동위원소 또는 형광 표지)로 태깅된 분자 (예를 들어 항체)를 투여하고 표지의 위치 결정을 위해 환자를 외부에서 스캐닝함으로써 생체내 검출 분석을 사용하여 평가할 수 있다.
- [1041] 상기한 바와 같이, 본 발명의 항-CD79b 항체는 다양한 비-치료 용도를 갖는다. 본 발명의 항-CD79b 항체는 CD79b 폴리펩티드-발현 암의 기 결정에 (예를 들어, 방사선촬영에서) 유용할 수 있다. 항체는 또한 세포로부터 CD79b 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전을 위해, 시험관 내에서, 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯으로의 CD79b 폴리펩티드의 검출 및 정량을 위해, 다른 세포의 정제에서 하나의 단계로서 혼합된 세포의 집단으로부터 CD79b-발현 세포를 사멸 및 제거하기 위해 유용하다.
- [1042] 현재, 암의 기수에 따라, 암 치료는 다음 요법의 하나 또는 조합을 수반한다: 암성 조직의 제거 수술, 방사선 요법, 및 화학요법. 항-CD79b 항체 요법은 화학요법의 독성 및 부작용을 잘 견디지 못하는 노인 환자에서, 및 방사선 요법의 유용성이 제한되는 전이성 질병에 특히 바람직할 수 있다. 본 발명의 종양을 표적으로 하는 항-CD79b 항체는 질병의 초기 진단시에 또는 재발 동안 CD79b-발현 암의 완화에 유용하다. 치료 용도를 위해, 항-CD79b 항체는 단독으로, 또는 예를 들어 호르몬, 항혈관신생제, 또는 방사성 표지된 화합물과 조합하여, 또는 수술, 한랭요법 및/또는 방사선 요법과 함께 사용될 수 있다. 항-CD79b 항체 치료제는 다른 형태의 통상적인 요법과 함께 그와 연속적으로 또는 통상적인 요법 전에 또는 후에 투여될 수 있다. 화학요법 약물, 예를 들어 TAXOTERE® (도세탁셀), TAXOL® (파클리탁셀), 에스트라무스틴 및 미톡산트론은 특히 저위험 (good risk) 환자에서 암을 치료하는데 사용된다. 암을 치료 또는 완화하기 위한 본 발명의 방법에서, 암 환자에게 항-CD79b 항체를 하나 이상의 상기한 화학요법제를 사용한 치료와 함께 투여할 수 있다. 특히, 파클리탁셀 및 변형된 유도체를 사용한 조합 요법 (예를 들어, EP0600517 참조)이 고려된다. 항-CD79b 항체는 치료 유효 용량의 화학요법제와 함께 투여될 것이다. 다른 실시태양에서, 항-CD79b 항체는 화학요법제, 예를 들어, 파클리탁셀의 활성 및 효능을 향상시키기 위해 화학요법제와 함께 투여된다. 문헌 [Physicians' Desk Reference (PDR)]에는 다양한 암의 치료에 사용된 이들 물질의 투여량이 개시되어 있다. 치료상 효과적인 이들 언급된 화학요법 약물의 투약 방법 및 투여량은 치료할 특정 암, 질병의 정도 및 관련 의사가 잘 알고 있는 다른 요인에 따라 결정될 것이고, 의사가 결정할 수 있다.
- [1043] 하나의 특정 실시태양에서, 세포독성제에 접합된 항-CD79b 항체를 포함하는 접합체가 환자에게 투여된다. 바람직하게는, CD79b 단백질에 결합된 면역접합체는 세포에 의해 내재화되어, 면역접합체가 결합한 암 세포를 사멸 시키는데 있어서 면역접합체의 치료 효능을 증가시킨다. 바람직한 실시태양에서, 세포독성제는 암 세포에서 핵산을 표적으로 하거나 저해한다. 그러한 세포독성제의 예는 상기 기재하였고, 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제를 포함한다.
- [1044] 항-CD79b 항체 또는 그의 독소 접합체는 공지된 방법에 따라, 예를 들어 정맥내 투여, 예를 들어 볼러스 (bolus)로서 또는 일정 시간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액내, 경막내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 인간 환자에게 투여된다. 항체의 정맥내 또는 피하 투여가

바람직하다.

- [1045] 다른 치료 요법이 항-CD79b 항체의 투여와 조합될 수 있다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제제 제제를 사용하는 동시 투여, 및 어느 한 순서로의 연속 투여를 포함하고, 여기서, 바람직하게는 두 (또는 모든) 활성제는 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 시간이 존재한다. 바람직하게는, 그러한 조합 요법은 상승적 치료 효과를 생성시킨다.
- [1046] 항-CD79b 항체(들)의 투여를 특정 암과 연관된 다른 종양 항원에 대해 생성된 항체의 투여와 조합하는 것이 또한 바람직할 수 있다.
- [1047] 다른 실시태양에서, 본 발명의 치료 목적의 처치 방법은 항-CD79b 항체(들), 및 하나 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (상이한 화학요법제들, 또는 종양 성장을 또한 억제하는 다른 세포독성제(들) 또는 다른 치료제(들)의 각테일 (cocktail)의 동시 투여를 포함함)를 포함한다. 화학요법제는 에스트라무스틴 포스페이트, 프레드니무스틴, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 멜파란, 시클로포스파미드, 히드록시우레아 및 히드록시우레아탁산 (예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라사이클린 항생제를 포함한다. 그러한 화학요법제에 대한 제조 및 투약 스케줄은 제조자의 지시에 따라 또는 당업자가 경험적으로 결정하는 바와 같이 사용될 수 있다. 그러한 화학요법에 대한 제조 및 투약 스케줄은 또한 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다. 항체는 항-호르몬 화합물; 예를 들어, 항-에스트로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜; 항-프로게스테론, 예를 들어 오나프리스톤 (EP 616 812 참조); 또는 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드와 그러한 분자에 대해 공지된 용량으로 조합될 수 있다. 치료할 암이 안드로겐 비의존 암인 경우에, 환자는 앞서 항-안드로겐 요법을 받을 수 있고, 암이 안드로겐 비의존성으로 된 후, 항-CD79b 항체 (및 임의로 본원에 기재된 다른 물질)를 환자에게 투여할 수 있다.
- [1048] 때때로, 또한 심장보호제 (요법과 연관된 심근 기능부전을 예방 또는 감소시키기 위해) 또는 하나 이상의 시토킨을 환자에게 동시 투여하는 것이 유익할 수 있다. 상기 치료 요법에 추가로, 환자는 항체 요법 전에, 동시에 또는 그 후에 암 세포의 수술 제거 및/또는 방사선 요법 (예를 들어 외부 빔 방사선 조사 또는 방사성 표지된 물질, 예를 들어 항체를 사용한 요법)을 받을 수 있다. 상기 동시 투여되는 임의의 물질에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 양이고, 물질과 항-CD79b 항체의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 낮추어질 수 있다.
- [1049] 본 발명의 항체 조성물은 우수 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이러한 측면에서 고려되는 인자는 치료될 특정 질환, 치료될 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 질환의 원인, 물질의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료인에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체는 반드시 그럴 필요는 없지만 임의로 해당 질환을 예방 또는 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 물질과 함께 제제화된다. 그러한 다른 물질의 유효량은 제제 내의 본 발명의 항체의 양, 질환 또는 치료의 종류, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 결정된다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 사용된 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.
- [1050] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 투여량 및 투여 방식은 공지된 기준에 따라 의사가 선택할 것이다. 항체의 적절한 투여량은 상기 규정한 바와 같은 치료할 질병의 종류, 질병의 심도 및 과정, 항체가 예방 목적으로 투여되는지 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 결정될 것이다. 항체는 적합하게는 1회에 또는 일련의 처리에 걸쳐 환자에게 투여된다. 바람직하게는, 항체는 정맥내 주입 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 질병의 종류 및 심도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 연속 주입에 의해서든 약 1 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg 체중 (예를 들어 약 0.1-15 mg/kg/용량)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 투약 요법은 약 4 mg/kg의 초기 로딩 용량, 이어서 약 2 mg/kg의 항-CD79b 항체의 매주 유지 용량을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 병태에 따라 치료는 질병 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속할 것이다. 상기 요법의 진행은 통상적인 방법 및 분석에 의해 및 의사 또는 다른 당업자에게 공지되어 있는 기준에 기초하여 쉽게 모니터링될 수 있다.
- [1051] 항체 단백질을 환자에 투여하는 것 이외에, 본원은 유전자 요법에 의한 항체의 투여를 고려한다. 항체를 코딩하는 핵산의 그러한 투여는 표현 "치료 유효량의 항체의 투여"에 포함된다. 예를 들어, 세포 내에서 항체를 생산하기 위한 유전자 요법의 사용에 대해서는 W096/07321 (1996년 3월 14일 공개)를 참조한다.
- [1052] 핵산 (임의로 벡터에 포함된)을 생체 내에서 및 생체 외에서 환자의 세포 내로 도입하기 위한 2가지의 주요 방

법이 존재한다. 생체 내 전달을 위해, 핵산은 대체로 항체가 필요한 부위에서 환자 내로 직접 주사된다. 생체 외 치료를 위해, 환자의 세포를 분리하고, 핵산을 이들 분리된 세포 내로 도입하고, 변형된 세포를 직접 또는 예를 들어 환자 내로 이식되는 다공성 막 내에 봉입시켜 환자에게 투여한다 (예를 들어, 미국 특허 4,892,538 및 5,283,187 참조). 핵산을 생존가능 세포 내로 도입하기 위해 다양한 기술이 이용가능하다. 기술은 핵산이 시험관 내에서 배양된 세포 내로 전달되는지, 또는 생체 내에서 의도하는 숙주의 세포 내로 전달되는지에 따라 상이하다. 시험관 내에서 포유동물 세포 내로 핵산의 전달에 적합한 기술은 리포솜의 사용, 전기천공, 미세주사, 세포 융합, DEAE-텍스트란, 인산칼슘 침전 방법 등을 포함한다. 유전자의 생체 외 전달을 위해 흔히 사용되는 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.

[1053] 현재 바람직한 생체 내 핵산 전달 기술은 바이러스 벡터 (예를 들어 아데노바이러스, 제1형 단순 포진 바이러스, 또는 아데노-연관 바이러스) 및 지질 기반 시스템 (유전자의 지질 매개 전달에 유용한 지질은 예를 들어 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol임)을 사용한 형질감염을 포함한다. 현재 공지된 유전자 마킹 및 유전자 요법 프로토콜에 대해서는, 문헌 [Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)]을 참조한다. 또한 WO 93/25673과 여기에 인용된 참조문을 참조한다.

[1054] 본 발명의 항-CD79b 항체는 본원에서 "항체"의 정의에 포함되는 상이한 형태로 존재할 수 있다. 따라서, 항체는 전장 또는 무손항 항체, 항체 단편, 천연 서열 항체 또는 아미노산 변이체, 인간화, 키메라 또는 융합 항체, 면역접합체, 및 그의 기능성 단편을 포함한다. 융합 항체에서, 항체 서열은 이중성 폴리펩티드 서열에 융합된다. 항체는 목적하는 효과기 기능을 제공하도록 Fc 영역에서 변형될 수 있다. 본원의 섹션에서 보다 상세히 논의한 바와 같이, 적절한 Fc 영역을 사용하여, 세포 표면에 결합된 네이키드 항체는 예를 들어, 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)을 통해 또는 보체 의존성 세포독성에서 보체를 동원함으로써, 또는 일부 다른 메커니즘에 의해 세포독성을 유도할 수 있다. 별법으로, 부작용 또는 치료 합병증을 최소화하도록 효과기 기능을 제거하거나 감소시키는 것을 원하는 경우에는, 특정 다른 Fc 영역을 사용할 수 있다.

[1055] 한 실시태양에서, 항체는 본 발명의 항체와 동일한 에피토프에의 결합에 대해 경쟁하고 실질적으로 결합한다. 본 발명의 항-CD79b 항체의 생물학적 특징, 구체적으로 예를 들어 생체내 종양 표적화 및 임의의 세포 증식 억제 또는 세포독성 특징을 갖는 항체가 또한 고려된다.

[1056] 상기 항체의 생산 방법은 본원에 상세히 설명한다.

[1057] 본 발명의 항-CD79b 항체는 포유동물에서 CD79b-발현 암을 치료하거나, 암의 하나 이상의 증상을 완화시키기 위해 유용하다. 그러한 암은 조혈계 암 또는 혈액-관련 암, 예를 들어 림프종, 백혈병, 골수종 또는 림프양 악성 종양, 및 비장암 및 림프절의 암을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 암의 보다 특정한 예는 그러한 B-세포 연관 암, 예를 들어 고등급, 중등급 및 저등급 림프종 (B 세포 림프종, 예를 들어 점막-연관-림프양 조직 B 세포 림프종 및 비-호지킨 림프종, 외투층 세포 림프종, 버키트 림프종, 소형 림프구성 림프종, 변연대 림프종, 미만성 대세포 림프종, 여포성 림프종, 및 호지킨 림프종 및 T 세포 림프종 포함) 및 백혈병 (2차 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 예를 들어 B 세포 백혈병 (CD5+ B 림프구 포함), 골수성 백혈병, 예를 들어 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 림프구성 백혈병, 예를 들어 급성 림프모구 백혈병 및 골수이형성증), 및 다른 혈액 및/또는 B 세포- 또는 T-세포-연관 암을 포함한다. 암은 상기한 임의의 암의 전이암을 포함한다. 항체는 포유동물에서 CD79b 폴리펩티드를 발현하는 암 세포의 적어도 일부에 결합할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 세포 상의 CD79b 폴리펩티드에 결합시에 CD79b-발현 종양 세포를 파괴하거나 사멸시키기 위해, 또는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 그러한 종양 세포의 성장을 억제하기 위해 효과적이다. 그러한 항체는 네이키드 항-CD79b 항체 (임의의 물질에 접합되지 않은)를 포함한다. 세포독성 또는 세포 성장 억제 특성을 갖는 네이키드 항체에는 종양 세포 파괴에서 더욱 더 강력하게 만드는 세포독성제를 추가로 포함시킬 수 있다. 세포독성 특성은 항체를 세포독성제와 접합시켜 본원에 기재된 바와 같은 면역접합체를 형성함으로써 항-CD79b 항체에 부여될 수 있다. 세포독성제 또는 성장 억제제는 바람직하게는 소분자이다. 독소, 예를 들어 칼리케아미신 또는 메이탄시노이드 및 그의 유사체 또는 유도체가 바람직하다.

[1058] 본 발명은 본 발명의 항-CD79b 항체, 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 암을 치료하기 위한 목적에서, 조성물은 그러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있고, 여기서 조성물은 면역접합체로서 또는 네이키드 항체로서 존재하는 하나 이상의 항-CD79b 항체를 포함할 수 있다. 추가의 실시태양에서, 조성물은 이들 항체를 다른 치료제, 예를 들어 세포독성제 또는 성장 억제제, 예를 들어 화학요법제와 조합으로 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 항-CD79b 항체, 및 담체를 포함하는 제제를 제공한다. 한 실시태양에서, 제제는 제약상 허용되는 담체를 포함하는 치료 제제이다.

- [1059] 본 발명의 다른 측면은 항-CD79b 항체를 코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 천연 서열 항체뿐만 아니라 항체의 변이체, 변형 및 인간화 버전을 코딩하는, H 및 L 사슬 모두 및 특히 초가변 영역 잔기를 코딩하는 핵산이 포함된다.
- [1060] 본 발명은 또한 치료 유효량의 항-CD79b 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 CD79b 폴리펩티드-발현 암을 치료하거나 암의 하나 이상의 증상을 완화시키기 위해 유용한 방법을 제공한다. 항체 치료 조성물은 의사의 지시에 따라 단기간 (급성) 또는 만성, 또는 간헐적으로 투여될 수 있다. CD79b 폴리펩티드-발현 세포의 성장을 억제하고, 상기 세포를 사멸시키는 방법을 또한 제공한다.
- [1061] 본 발명은 또한 적어도 하나의 항-CD79b 항체를 포함하는 키트 및 제품을 제공한다. 항-CD79b 항체를 함유하는 키트는 예를 들어, CD79b 세포 사멸 분석, 세포로부터 CD79b 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전을 위해 사용된다. 예를 들어, CD79b의 단리 및 정제를 위해, 키트는 비드 (예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 항-CD79b 항체를 포함할 수 있다. 시험관 내에서, 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯으로의 CD79b 폴리펩티드의 검출 및 정량을 위한 항체를 포함하는 키트를 제공할 수 있다. 검출을 위해 유용한 그러한 항체에는 형광 또는 방사성 표지와 같은 표지가 제공될 수 있다.
- [1062] I. 항체-약물 접합체 치료
- [1063] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 예를 들어 종양 항원의 과다발현을 특징으로 하는 다양한 질병 또는 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 예시적인 병태 또는 과다증식성 장애는 양성 또는 악성 종양; 백혈병 및 림프양 악성종양을 포함한다. 다른 질환은 신경, 신경교, 성상세포, 시상하부, 선상, 포식세포, 상피, 기질성, 포배강, 염증성, 혈관신생성 및 면역, 예를 들어 자가면역 질환을 포함한다.
- [1064] 동물 모델 및 세포-기반 분석으로 확인되는 ADC 화합물은 종양을 보유하는 보다 고등 영양류 및 인간 임상 시험으로 추가로 시험할 수 있다. 인간 임상 시험은 비제한적으로 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종을 포함한 B 세포 증식성 장애를 겪는 환자에서 본 발명의 항-CD79b 모노클로날 항체 또는 면역접합체의 효능을 시험하기 위해 설계될 수 있다. 임상 시험은 공지의 치료 요법, 예를 들어 공지의 화학요법제 및/또는 세포독성제를 수반한 방사선 요법 및/또는 화학요법과 조합하여 ADC의 효능을 평가하도록 설계될 수 있다.
- [1065] 일반적으로, 치료할 질병 또는 질환은 과다증식성 장애, 예를 들어 B 세포 증식성 장애 및/또는 B 세포 암이다. 본원에서 치료할 암의 예는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종 중에서 선택되는 B 세포 증식성 장애를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [1066] 암은 본 발명의 ADC가 암 세포에 결합할 수 있도록, CD79b-발현 세포를 포함할 수 있다. 암에서 CD79b 발현을 결정하기 위해, 다양한 진단/예후 분석이 이용가능하다. 한 실시태양에서, CD79b 과다발현은 IHC에 의해 분석할 수 있다. 종양 생검물로부터 파라핀-포매 조직 절편을 IHC 분석에 적용하고, 검사되는 종양 세포의 염색 정도에 대해 및 검사되는 비율에서 CD79b 단백질 염색 강도 기준을 부여할 수 있다.
- [1067] 질병의 예방 또는 치료를 위해, ADC의 적절한 투여량은 상기 규정된 바와 같이 치료할 질병의 종류, 질병의 심도 및 과정, 분자가 예방 목적으로 투여되는지 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 결정될 것이다. 분자는 적합하게는 1회에 또는 일련의 처리에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질병의 종류 및 심도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 연속 주입에 의해서든 약 1 μ g/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg)의 분자가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상일 수 있다. 환자에게 투여할 ADC의 예시적인 투여량은 약 0.1 내지 약 10 mg/kg (환자 체중) 범위이다.
- [1068] 병태에 따라 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 치료는 질병 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속한다. 예시되는 투약 요법은 약 4 mg/kg의 초기 로딩 용량의 항-ErbB2 항체를 투여한 후, 약 2 mg/kg의 매주 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 다른 투약 요법도 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 쉽게 모니터링된다.
- [1069] J. 조합 요법

- [1070] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 항암 특성을 지닌 제2 화합물과 제약 조합 제제 내에 또는 조합 요법으로서 투약 방법으로 조합될 수 있다. 제약 조합 제제 또는 투약 방법의 제2 화합물은 바람직하게는 서로 불리한 영향을 미치지 않도록 조합물의 ADC에 대한 상보적 활성을 갖는다.
- [1071] 제2 화합물은 화학요법제, 세포독성제, 시토킨, 성장 억제제, 항-호르몬제, 및/또는 심장보호제일 수 있다. 이러한 분자는 적합하게는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합물 내에 존재한다. 본 발명의 ADC를 함유하는 제약 조성물은 또한, 치료 유효량의 화학요법제, 예를 들어 튜블린-형성 억제제, 토포이소머라제 억제제 또는 DNA 결합제를 가질 수 있다.
- [1072] 한 측면에서, 제1 화합물은 본 발명의 항-CD79b ADC이고, 제2 화합물은 항-CD20 항체 (네이키드 항체 또는 ADC)이다. 한 실시태양에서, 제2 화합물은 항-CD20 항체 리툭시맵 (Rituxan®) 또는 2H7 (제넨텍, 인크., 미국 캘리포니아주 싸우스샌프란시스코)이다. 본 발명의 항-CD79b ADC와의 조합 면역 요법에 유용한 다른 항체는 비제한적으로 항-VEGF (예를 들어, Avastin®)를 포함한다.
- [1073] 비제한적으로 방사선 요법 및/또는 골수 및 말초혈액 이식, 및/또는 세포독성제, 화학요법제, 또는 성장 억제제를 포함한 다른 치료 요법을 본 발명에 따라 확인된 항암제의 투여와 조합할 수 있다. 그러한 한 실시태양에서, 화학요법제는 하나의 물질 또는 물질들의 조합물, 예를 들어, 시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빈크리스틴 (Oncovin™), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역치료제, 예를 들어 항-CD20 (예를 들어, Rituxan®) 또는 항-VEGF (예를 들어, Avastin®)이다.
- [1074] 조합 요법은 동시 또는 순차적 요법으로서 투여할 수 있다. 순차적으로 투여될 때, 조합물을 2회 이상의 투여로 투여할 수 있다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하는 동시 투여, 및 어느 한 순서의 연속 투여를 포함하고, 여기서, 바람직하게는 두 (또는 모든) 활성제는 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 시간이 존재한다.
- [1075] 한 실시태양에서, ADC를 이용한 치료는 본원에서 확인된 항암제, 및 하나 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (상이한 화학요법제들의 각테일의 조합 투여를 포함함)를 포함한다. 화학요법제는 탁산 (예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라사이클린 항생제를 포함한다. 그러한 화학요법제에 대한 제조 및 투약 스케줄은 제조자의 지시에 따라 또는 당업자가 경험적으로 결정하는 바와 같이 사용될 수 있다. 그러한 화학요법에 대한 제조 및 투약 스케줄은 또한 문헌 ["Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md]에 기재되어 있다.
- [1076] 상기 동시 투여되는 임의의 물질에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 양이고, 새로 확인된 물질과 다른 화학요법제 또는 치료의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 낮추어질 수 있다.
- [1077] 조합 요법은 "상승작용"을 제공할 수 있고, "상승적"인 것으로 입증되었고, 즉 활성 성분들을 함께 사용할 때 달성된 효과가 화합물을 따로 사용하여 얻은 효과들의 합보다 더 크다. 상승적 효과는 활성 성분들을 (1) 조합된 단위 투여 제제로 동시-제제화하고 투여하거나 동시에 전달하거나; (2) 별개의 제제로서 교대로 또는 병행하여 전달하거나; (3) 몇몇 다른 요법에 의해 획득할 수 있다. 교대 요법으로 전달되는 경우에, 상승적 효과는 화합물을 예를 들어 별개의 주사기로 상이한 주사에 의해 순차적으로 투여 또는 전달할 때 획득할 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안에는 각각의 활성 성분의 유효 투여량을 순차적으로, 즉 연속적으로 투여하는 반면, 조합 요법에서는 2가지 이상 활성 성분의 유효 투여량을 함께 투여한다.
- [1078] K. 제품 및 키트
- [1079] 본 발명의 다른 실시태양은 CD79b-발현 암의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제품이다. 제품은 용기, 및 용기 위에 있거나 용기와 연합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 다양한 물질, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 암 병태의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 항-CD79b 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 암의 치료를 위해 사용됨을 나타낸다. 라벨 또는 포장 삽입물은 암 환자에게 항체 조성물을 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함할 것이다. 추가로, 제품은 제약상 허용되는 버퍼, 예를 들어 주사용 정균수 (BWF1), 인산염 완충염수, 링거 (Ringer)액 및 텍스트로스 용액을 포함한 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제품은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 버퍼, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

- [1080] 다양한 목적, 예를 들어 CD79b-발현 세포 사멸 분석, 세포로부터 CD79b 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전을 위해 유용한 키트도 제공된다. CD79b 폴리펩티드의 단리 및 정제를 위해, 키트는 비드 (예를 들어, 세포로스 비드)에 커플링된 항-CD79b 항체를 포함할 수 있다. 시험관 내에서, 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯으로의 CD79b 폴리펩티드의 검출 및 정량을 위한 항체를 포함하는 키트를 제공할 수 있다. 제품처럼, 키트는 용기, 및 용기 위에 있거나 용기와 연합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 용기는 본 발명의 적어도 하나의 항-CD79b 항체를 포함하는 조성물을 보유한다. 예를 들어, 희석제 및 버퍼, 대조 항체를 함유하는 추가의 용기가 포함될 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물에 대한 설명 및 의도하는 시험관 내 또는 검출 용도에 대한 설명서를 제공할 수 있다.
- [1081] L. CD79b 폴리펩티드에 대한 용도
- [1082] 본 발명은 CD79b 폴리펩티드를 흉내내는 물질 (작용제) 또는 CD79b 폴리펩티드의 효과를 방지하는 물질 (길항제)을 확인하기 위해 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다. 길항제 약물 후보에 대한 스크리닝 분석은 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 CD79b 폴리펩티드에 결합하거나 복합체를 형성하거나, 또는 달리 예를 들어, 세포로부터 CD79b 폴리펩티드의 발현을 억제하는 것을 포함하여 다른 세포성 단백질과 코딩된 폴리펩티드의 상호작용을 저해하는 화합물을 확인하기 위해 설계된다. 상기 스크리닝 분석은 화학적 라이브러리의 고효율 스크리닝에 적용가능한 분석을 포함할 것이고, 이는 소분자 약물 후보를 확인하기 위해 특히 적합하도록 한다.
- [1083] 분석은 그 특성이 당업계에서 잘 규명된 단백질-단백질 결합 분석, 생화학적 스크리닝 분석, 면역분석, 및 세포-기반 분석을 포함한 다양한 포맷으로 수행할 수 있다.
- [1084] 길항제에 대한 모든 분석은 2가지 성분의 상호작용을 허용하는 조건 하에서 및 충분한 시간 동안 본원에서 확인된 핵산에 의해 코딩되는 CD79b 폴리펩티드와 약물 후보를 접촉시키는 것을 필요로 하는 점에서 공통적이다.
- [1085] 결합 분석에서, 상호작용은 결합이고, 형성된 복합체는 반응 혼합물 내에서 단리되거나 검출될 수 있다. 특정 실시태양에서, 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 CD79b 폴리펩티드 또는 약물 후보를 고체상, 예를 들어, 미세적정 플레이트 상에, 공유 또는 비-공유 부착에 의해 고정시킨다. 비-공유 부착은 일반적으로 고체 표면을 CD79b 폴리펩티드의 용액으로 코팅하고 건조시켜 달성한다. 별법으로, 고정시킬 CD79b 폴리펩티드에 특이적인 고정된 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체를 사용하여 그를 고체 표면에 고착시킬 수 있다. 분석은 검출가능 표지로 표지될 수 있는 비-고정된 성분을 고정된 성분, 예를 들어 고착된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 첨가함으로써 수행한다. 반응이 완료되면, 비-반응 성분은 예를 들어 세척에 의해 제거하고, 고체 표면에 고착된 복합체를 검출한다. 본래의 비-고정된 성분이 검출가능한 표지를 보유하는 경우에, 표면 상에 고정된 표지의 검출은 복합체가 형성되었음을 나타낸다. 본래의 비-고정된 성분이 표지를 보유하지 않는 경우에는, 복합체 형성은 예를 들어 고정된 복합체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용하여 검출할 수 있다.
- [1086] 후보 화합물이 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 특정 CD79b 폴리펩티드와 상호작용하지만 그에 결합하지는 않는 경우에, 폴리펩티드와 그의 상호작용은 단백질-단백질 상호작용을 검출하기 위한 잘 공지되어 있는 방법에 의해 분석할 수 있다. 그러한 분석은 예를 들어 가교결합, 동시-면역침전, 및 구배 또는 크로마토그래피 컬럼을 통한 동시-정제와 같은 전통적인 방법을 포함한다. 추가로, 단백질-단백질 상호작용은 문헌 [Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991)]에 개시된 바와 같이 필즈 (Fields)와 동료 ([Fields and Song, Nature (London), 340:245-246 (1989)]; [Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)])에 의해 설명된 효모 기반 유전자 시스템을 사용하여 모니터링할 수 있다. 많은 전사 활성화요소, 예를 들어 효모 GAL4는 2개의 물리적으로 구분되는 모듈 (modular) 도메인으로 이루어지고, 여기서 하나의 도메인은 DNA-결합 도메인으로 작용하고, 다른 하나의 도메인은 전사-활성화 도메인으로 작용한다. 상기 공개문에 기재된 효모 발현 시스템 (일반적으로 "2-하이브리드 시스템"으로 칭함)은 상기 특성을 이용하고, 2개의 하이브리드 단백질을 사용하며, 여기서 하나의 단백질에서는 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인에 융합되고, 다른 단백질에서는 후보 활성화 단백질이 활성화 도메인에 융합된다. GAL4-활성화된 프로모터의 제어 하에 GAL1-lacZ 리포터 유전자의 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성화의 재구성에 따라 결정된다. 상호작용 폴리펩티드를 함유하는 콜로니는 β -갈락토시다제에 대한 발색 기질을 사용하여 검출한다. 2-하이브리드 기술을 사용하여 2개의 특이적 단백질 사이의 단백질-단백질 상호작용을 확인하기 위한 완전한 키트 (MATCHMAKER™)는 클론텍 (Clontech)으로부터 상업적으로 입수가능하다. 상기 시스템은 또한 특이적 단백질 상호작용에 관여되는 단백질 도메인의 지도를 작성하고, 이들 상호작용에 중대한 아미노산 잔기의 위치를 정확하게 제시하도록 확장될 수 있다.
- [1087] 본원에서 확인된 CD79b 폴리펩티드를 코딩하는 유전자와 다른 세포내 또는 세포외 성분의 상호작용을 방해하는

화합물은 다음과 같이 시험할 수 있다: 대체로, 유전자의 생성물 및 세포내 또는 세포외 성분을 함유하는 반응 혼합물은 2개의 생성물의 상호작용 및 결합을 허용하는 조건 하에 충분한 시간 동안 제조된다. 결합을 억제하는 후보 화합물의 능력을 시험하기 위해, 반응은 시험 화합물의 부재 및 존재 하에 실시한다. 추가로, 양성 대조군으로 역할을 하도록 위약을 제3 반응 혼합물에 첨가할 수 있다. 시험 화합물과 혼합물 내에 존재하는 세포내 또는 세포외 성분 사이의 결합 (복합체 형성)은 본원에서 상기한 바와 같이 모니터링한다. 시험 화합물을 함유하는 반응 혼합물에서가 아니라 대조 반응물(들)에서 복합체의 형성은 시험 화합물이 시험 화합물과 그의 반응 파트너의 상호작용을 방해함을 나타낸다.

[1088]

길항제에 대해 분석하기 위해, CD79b 폴리펩티드를 특정 활성에 대해 스크리닝할 화합물과 함께 세포에 첨가할 수 있고, CD79b 폴리펩티드의 존재 하에 목적하는 활성을 억제하는 화합물의 능력은 화합물이 CD79b 폴리펩티드에 대한 길항제임을 나타낸다. 별법으로, 길항제는 경쟁적 억제 분석에 적절한 조건 하에 CD79b 폴리펩티드 및 잠재적인 길항제를 막-결합된 CD79b 폴리펩티드 수용체 또는 재조합 수용체와 조합함으로써 검출할 수 있다. 수용체에 결합된 CD79b 폴리펩티드 분자의 수를 사용하여 잠재적인 길항제의 유효성을 결정할 수 있도록, CD79b 폴리펩티드는 예를 들어 방사성에 의해 표지할 수 있다. 수용체를 코딩하는 유전자는 당업자에게 공지된 수많은 방법, 예를 들어 리간드 패닝 및 FACS 분류에 의해 확인할 수 있다 (Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)). 바람직하게는, 폴리아데닐화 RNA를 CD79b 폴리펩티드에 반응성인 세포로부터 제조하고, 상기 RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리를 풀 (pool)로 분할하고 CD79b 폴리펩티드에 비반응성인 COS 세포 또는 다른 세포를 형질감염시키기 위해 사용하는 발현 클로닝이 사용된다. 유리 슬라이드 상에서 성장시킨 형질감염된 세포를 표지된 CD79b 폴리펩티드에 노출시킨다. CD79b 폴리펩티드는 요오드화, 또는 부위-특이적 단백질 키나제에 대한 인식 부위의 도입을 포함한 다양한 수단에 의해 표지될 수 있다. 고정 및 인큐베이션 후에, 슬라이드를 자가방사술 분석에 적용한다. 양성 풀을 확인하고, 하위 풀을 제조하고, 상호작용성 하위 풀 수거를 사용하여 재형질감염시키고, 재-스크리닝 과정을 통해 최종적으로 추정 수용체를 코딩하는 단일 클론을 생성시킨다.

[1089]

또다른 수용체 확인 방법으로서, 표지된 CD79b 폴리펩티드는 수용체 분자를 발현하는 세포막 또는 추출물 제제와 광친화도-연결될 수 있다. 가교결합된 물질은 PAGE에 의해 분리하여 X-선 필름에 노출시킨다. 수용체를 함유하는 표지된 복합체를 절제하고, 펩티드 단편으로 분리한 후, 단백질 미세 서열결정 (micro-sequencing) 과정에 적용할 수 있다. 미세 서열결정으로부터 얻은 아미노산 서열은 추정 수용체를 코딩하는 유전자를 확인하기 위해 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위해 다의성 올리고뉴클레오타이드 프로브의 세트를 디자인하기 위해 사용될 것이다.

[1090]

길항제에 대한 다른 분석에서, 수용체를 발현하는 포유동물 세포 또는 막 제제를 후보 화합물의 존재 하에 표지된 CD79b 폴리펩티드와 함께 인큐베이팅할 것이다. 이어서, 상기 상호작용을 향상 또는 차단하는 화합물의 능력을 측정할 수 있다.

[1091]

잠재적인 길항제의 보다 특정한 예는 면역글로불린과 CD79b 폴리펩티드의 융합체에 결합하는 올리고뉴클레오타이드, 및 특히 비제한적으로 폴리클로날 및 모노클로날 항체 및 항체 단편, 단일쇄 항체, 항-개별특이형 항체, 및 상기 항체 또는 단편의 키메라 또는 인간화 형태, 및 인간 항체 및 항체 단편을 포함하는 항체를 포함한다. 별법으로, 잠재적인 길항제는 밀접하게 관련된 단백질, 예를 들어 수용체를 인식하지만 효과를 나타내지 못하여 CD79b 폴리펩티드의 작용을 경쟁적으로 억제하는 돌연변이된 형태의 CD79b 폴리펩티드일 수 있다.

[1092]

본원에서 확인된 CD79b 폴리펩티드, 및 상기 개시된 스크리닝 분석에 의해 확인된 다른 분자에 특이적으로 결합하는 항체는 암을 포함한 다양한 질환의 치료를 위해 제약 조성물 형태로 투여될 수 있다.

[1093]

CD79b 폴리펩티드가 세포내성이고, 전체 항체가 억제제로서 사용되면, 내재화 항체가 바람직하다. 그러나, 항체 또는 항체 단편을 세포 내로 전달하기 위해 리포감염 (lipofection) 또는 리포솜이 또한 사용될 수 있다. 항체 단편이 사용되는 경우에, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변-영역 서열에 기초하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 그러한 펩티드는 화학적으로 합성하고/하거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수 있다 (예를 들어, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993) 참조).

[1094]

본원의 제제는 또한 치료할 특정 적응증에 필요하면 하나 초과와 활성 화합물, 바람직하게는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 조성물은 그의 기능을 향상시키는 물질, 예를 들어 세포독성제, 시토킨, 화학요법제 또는 성장억제제를 포함할 수 있다. 그러한 분자는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합으로 존재한다.

- [1095] M. 항체 유도체
- [1096] 본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 쉽게 이용가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비-제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리에틸렌 (예를 들어 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이들의 혼합물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 그의 물에서 안정성 때문에 제조상 잇점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량의 것일 수 있고, 분지되거나 비분지될 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있고, 하나 초과 중합체가 부착되는 경우에 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 종류는 개선시킬 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 고려사항에 기초하여 결정할 수 있다.
- [1097] N. 스크리닝 방법
- [1098] 본 발명의 또다른 실시태양은 CD79b 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 샘플 내에서 CD79b 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 샘플을 CD79b 폴리펩티드에 결합하는 항체 약물 접합체에 노출시키고, 샘플 내의 CD79b 폴리펩티드에 대한 그의 항체 약물 접합체를 결정하는 것을 포함하고, 여기서 그러한 결합의 존재는 샘플 내에 CD79b 폴리펩티드의 존재를 표시한다. 임의로, 샘플은 CD79b 폴리펩티드를 발현하는 것으로 의심되는 세포 (암 세포일 수 있는)를 함유할 수 있다. 방법에서 사용되는 그의 항체 약물 접합체는 임의로 검출가능하게 표시되거나, 고체 지지체에 부착될 수 있다.
- [1099] 본 발명의 다른 실시태양은 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 (a) 포유동물로부터 얻은 조직 세포를 포함하는 시험 샘플을 CD79b 폴리펩티드에 결합하는 그의 항체 약물 접합체와 접촉시키고, (b) 그의 항체 약물 접합체와 시험 샘플 내의 CD79b 폴리펩티드 사이의 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하고, 여기서 복합체의 형성이 포유동물에서 종양의 존재를 표시한다. 임의로, 그의 항체 약물 접합체는 예를 들어 검출가능하게 표시되고, 고체 지지체에 부착되고/되거나 조직 세포의 시험 샘플은 양성 종양을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 얻는다.
- [1100] IV. 항-CD79b 항체 및 면역접합체를 사용하는 추가의 방법
- [1101] A. 진단 방법 및 검출 방법
- [1102] 한 측면에서, 본 발명의 항-CD79b 항체 및 면역접합체는 생물학적 샘플 내에서 CD79b의 존재를 검출하기 위해 유용하다. 용어 "검출하는"은 본원에서 사용될 때 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 실시태양에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 특정 실시태양에서, 그러한 조직은 다른 조직에 비해 더 높은 수준으로 CD79b를 발현하는 정상 및/또는 양성 조직, 예를 들어 B 세포 및/또는 B 세포 연관 조직을 포함한다.
- [1103] 한 측면에서, 본 발명은 생물학적 샘플 내에서 CD79b의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 방법은 생물학적 샘플을 CD79b에 대한 항-CD79b 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 항-CD79b 항체와 접촉시키고, 항-CD79b 항체와 CD79b 사이에 복합체가 형성되는지 검출하는 것을 포함한다.
- [1104] 한 측면에서, 본 발명은 CD79b의 증가된 발현과 연관된 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 방법은 시험 세포를 항-CD79b 항체와 접촉시키고; CD79b에 대한 항-CD79b 항체의 결합을 검출함으로써 시험 세포에 의한 CD79b의 발현 수준을 (정량적으로 또는 정성적으로) 결정하고; 시험 세포에 의한 CD79b의 발현 수준을 대조 세포 (예를 들어, 시험 세포와 동일한 조직에서 기원하는 정상 세포, 또는 상기 정상 세포와 대등한 수준으로 CD79b를 발현하는 세포)에 의한 CD79b의 발현 수준과 비교하는 것을 포함하고, 여기서 대조 세포에 비해 시험 세포에 의한 CD79b의 더 높은 발현 수준이 CD79b의 증가된 발현과 연관된 질환의 존재를 나타낸다. 특정 실시태양에서, 시험 세포는 CD79b의 증가된 발현과 연관된 질환이 있는 것으로 의심되는 개체로부터 얻는다. 특정 실시태양에서, 질환은 세포 증식성 장애, 예를 들어 암 또는 종양이다.
- [1105] 본 발명의 항체를 사용하여 진단할 수 있는 예시적인 세포 증식성 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포

림프종을 포함하고 이로 제한되지 않는 B 세포 질환 및/또는 B 세포 증식성 장애를 포함한다.

- [1106] 특정 실시태양에서, 상기한 바와 같은 진단 또는 검출의 방법은 세포 표면 상에서 또는 그의 표면 상에 CD79b를 발현하는 세포로부터 얻은 막 제제 내에서 발현된 CD79b에 대한 항-CD79b 항체의 결합을 검출하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 방법은 세포를 CD79b에 대한 항-CD79b 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 항-CD79b 항체와 접촉시키고, 항-CD79b 항체와 세포 표면 상의 CD79b 사이에 복합체가 형성되는지를 결정하는 것을 포함한다. 세포의 표면 상에 발현된 CD79b에 대한 항-CD79b 항체의 결합을 검출하기 위한 예시적인 분석은 "FACS" 분석이다.
- [1107] CD79b에 대한 항-CD79b 항체의 결합을 검출하기 위해 특정 다른 방법이 사용될 수 있다. 그러한 방법은 당업계에 잘 공지된 항원 결합 분석, 예를 들어 웨스턴 블롯, 방사면역분석법, ELISA (효소 연관 면역흡착 분석), "샌드위치 (sandwich)" 면역분석, 면역침전 분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석, 및 면역조직화학 (IHC)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [1108] 특정 실시태양에서, 항-CD79b 항체는 표지된다. 표지는 직접 검출되는 표지 또는 모이어티 (예를 들어 형광, 발색, 전자 밀집 (electron-dense), 화학발광, 및 방사성 표지), 및 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예를 들어 효소 또는 리간드를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 예시적인 표지는 방사성 동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , 형광단, 예를 들어 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단질, 옴벨리페론, 또는 루시페라제, 예를 들어, 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예를 들어 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예를 들어 유리카제 및 잔틴 옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 (spin) 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 유리 라디칼 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [1109] 특정 실시태양에서, 항-CD79b 항체는 불용성 매트릭스 상에 고정된다. 고정은 용액 내에 유리 상태로 남아있는 임의의 CD79b로부터 항-CD79b 항체를 분리하는 것을 수반한다. 이것은 통상적으로 분석 절차 전에 항-CD79b 항체의 불용화에 의해, 수불용성 매트릭스 또는 표면에 대한 흡착에 의해 (U.S. 3,720,760 (Bennich 등)), 또는 공유 커플링 (예를 들어, 글루타르알데히드 가교결합 사용)에 의해, 또는 예를 들어 면역침전에 의해 항-CD79b 항체와 CD79b 사이의 복합체 형성 후에 항-CD79b 항체의 불용화에 의해 달성된다.
- [1110] 진단 또는 검출의 임의의 상기 실시태양은 항-CD79b 항체 대신에 또는 그에 추가로 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행할 수 있다.
- [1111] B. 치료 방법
- [1112] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 예를 들어 시험관 내에서, 생체 외에서 및 생체 내에서 치료 방법에 사용될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명은 생체 내에서 또는 시험관 내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 방법을 제공하고, 이 방법은 세포를 CD79b에 대한 면역접합체의 결합을 허용하는 조건 하에 항-CD79b 항체 또는 그의 면역접합체에 노출시키는 것을 포함한다. "세포 성장 또는 증식을 억제하는"은 세포의 성장 또는 증식을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100% 감소시키는 것을 의미하고, 세포 사멸의 유도를 포함한다. 특정 실시태양에서, 세포는 종양 세포이다. 특정 실시태양에서, 세포는 B 세포이다. 특정 실시태양에서, 세포는 예를 들어 본원에 예시된 바와 같은 이중이식편이다.
- [1113] 한 측면에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 B 세포 증식성 장애를 치료하거나 예방하기 위해 사용된다. 특정 실시태양에서, 세포 증식성 장애는 CD79b의 증가된 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 예를 들어, 특정 실시태양에서, B 세포 증식성 장애는 B 세포의 표면에서 CD79b의 증가된 발현과 연관된다. 특정 실시태양에서, B 세포 증식성 장애는 종양 또는 암이다. 본 발명의 항체 또는 면역접합체에 의해 치료되는 B 세포 증식성 장애의 예는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [1114] 한 측면에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-CD79b 항체 또는 그의 면역접합체를 투여하는 것을 포함하는, B 세포 증식성 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, B 세포 증식성 장애를 치료하는 방법은 개체에게 항-CD79b 항체 또는 항-CD79b 면역접합체 및 임의로 적어도 하나의 추가의 치료제, 예를 들어 아래에 제

시된 것을 포함하는 제약 제제의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 세포 증식성 장애를 치료하는 방법은 개체에게 1) 항-CD79b 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체; 및 임의로 2) 적어도 하나의 추가의 치료제, 예를 들어 아래에 제시된 것을 포함하는 제약 제제의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[1115] 한 측면에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 적어도 일부는 인간 이외의 다른 종으로부터 유래한 CD79b에 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 예를 들어, CD79b를 함유하는 세포 배양액 내에서, 인간에서, 또는 본 발명의 항체 또는 면역접합체가 교차-반응하는 CD79b를 갖는 다른 포유동물 (예를 들어 침팬지, 비비 (baboon), 마모셋, 사이노몰거스 원숭이 및 붉은털 원숭이, 돼지 또는 마우스)에서 CD79b에 결합하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 항-CD79b 항체 또는 면역접합체는, 면역접합체의 접합된 세포독소가 세포 내부로 접근하도록 항체 또는 면역접합체를 CD79b와 접촉시켜 항체 또는 면역접합체-항원 복합체를 형성시킴으로써 B 세포 상의 CD79b를 표적화하는데 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, CD79b는 인간 CD79b이다.

[1116] 한 실시태양에서, 항-CD79b 항체 또는 면역접합체는 증가된 CD79b 발현 및/또는 활성화와 연관된 질환으로 고통받는 개체에서 CD79b를 결합시키는 방법에서 사용될 수 있고, 이 방법은 개체 내에 존재하는 CD79b가 결합되도록 개체에게 항체 또는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 결합된 항체 또는 면역접합체는 CD79b를 발현하는 B 세포 내로 내재화된다. 한 실시태양에서, CD79b는 인간 CD79b이고, 개체는 인간 개체이다. 별법으로, 개체는 항-CD79b 항체가 결합하는 CD79b를 발현하는 포유동물일 수 있다. 또한, 개체는 CD79b가 도입된 (예를 들어, CD79b의 투여에 의해 또는 CD79b를 코딩하는 트랜스젠 (transgene)의 발현에 의해) 포유동물일 수 있다.

[1117] 항-CD79b 항체 또는 면역접합체는 치료 목적으로 인간에게 투여될 수 있다. 또한, 항-CD79b 항체 또는 면역접합체는 수의용으로 또는 인간 질병의 동물 모델로서, 항체가 교차-반응하는 CD79b를 발현하는 비-인간 포유동물 (예를 들어, 영장류, 돼지, 래트 또는 마우스)에게 투여될 수 있다. 인간 질병의 동물 모델의 경우에, 상기 동물 모델은 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 치료 효능을 평가하는데 (예를 들어, 투여량 및 투여의 시간 경과를 시험하는데) 유용할 수 있다.

[1118] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 요법에서 단독으로 또는 다른 조성물과 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 적어도 하나의 추가의 치료제 및/또는 어쥬번트와 동시 투여될 수 있다. 특정 실시태양에서, 추가의 치료제는 세포독성제, 화학요법제, 또는 성장 억제제이다. 그러한 한 실시태양에서, 화학요법제는 하나의 물질 또는 물질들의 조합물, 예를 들어, 시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빈크리스틴 (Oncovin™), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역치료제, 예를 들어 항-CD20 (예를 들어, Rituxan®) 또는 항-VEGF (예를 들어, Avastin®)이고, 여기서 조합요법은 암 및/또는 B 세포 질환, 예를 들어 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종을 포함한 B 세포 증식성 장애의 치료에 유용하다.

[1119] 상기한 그러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서, 2 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 제제에 포함된다) 및 별개의 투여를 포함하고, 그 경우에, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 어쥬번트의 투여 전, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 수행될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 또한 방사선 요법과 조합으로 사용될 수도 있다.

[1120] 본 발명의 항체 또는 면역접합체 (및 임의의 추가의 치료제 또는 어쥬번트)는 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 국소 치료용으로 필요할 경우에 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 추가로, 항체 또는 면역접합체는 적합하게는 특히, 감소하는 투여량의 항체 또는 면역접합체를 사용하는 경우에 펄스 주입에 의해 투여된다. 투약은 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 부분적으로는 투여가 짧은지 또는 장기인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행할 수 있다.

[1121] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 우수 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이러한 측면에서 고려되는 인자는 치료될 특정 질환, 치료될 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 질환의 원인, 물질의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료인에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체 또는 면역접합체는 반드시 그럴 필요는 없지만 임의로 해당 질환을 예방 또는 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 물질과 함께 제제화된다. 그러한 다른 물질의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체 또는 면역접합체의 양, 질환

또는 치료의 종류, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 결정된다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 경험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로로 사용된다.

[1122] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 화학요법제와 같은 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합으로 사용될 때)은 치료될 질병의 종류, 항체 또는 면역접합체의 종류, 질병의 심도 및 과정, 항체 또는 면역접합체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상력 및 항체 또는 면역접합체에 대한 반응, 및 담당 의사의 결정에 따라 결정될 것이다. 항체 또는 면역접합체는 적합하게는 1회에 또는 일련의 처리에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질병의 종류 및 심도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 연속 주입에 의해서든 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg (예를 들어 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg)의 항체 또는 면역접합체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 이상일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 병태에 따라 치료는 일반적으로 질병 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속할 것이다. 항체 또는 면역접합체의 한 가지 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위의 일일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합)의 항체 또는 면역접합체 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 그러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 (예를 들어 환자가 약 2 내지 약 20회, 예를 들어 약 6회 용량의 항체 또는 면역접합체를 투여받도록) 투여될 수 있다. 보다 높은 초기 로딩 용량, 이어서 1회 이상의 보다 낮은 용량이 투여될 수 있다. 예시적인 투약 용법은 약 4 mg/kg의 항체의 초기 로딩 용량 후에 약 2 mg/kg의 항체의 매주 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투약 용법도 유용할 수 있다. 상기 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 쉽게 모니터링된다.

[1123] C. 활성 분석

[1124] 본 발명의 항-CD79b 항체 및 면역접합체는 당업계에 공지된 다양한 분석에 의해 그들의 물리/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특성 결정할 수 있다.

[1125] 1. 활성 분석

[1126] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-CD79b 항체 또는 그의 면역접합체를 확인하기 위한 분석이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 세포 성장 또는 증식을 억제하는 능력 (예를 들어, "세포 사멸" 활성), 또는 예정된 세포 사멸 (세포자멸)을 포함한 세포 사멸을 유도하는 능력을 포함할 수 있다. 생체 내에서 및/또는 시험관 내에서 그러한 생물학적 활성을 갖는 항체 또는 면역접합체를 또한 제공한다.

[1127] 특정 실시태양에서, 항-CD79b 항체 또는 그의 면역접합체를 시험관 내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험한다. 세포 성장 또는 증식 억제에 대한 분석은 당업계에 잘 알려져 있다. 본원에 기재된 "세포 사멸" 분석으로 예시된, 세포 증식에 대한 특정 분석에서는 세포 생활력을 측정한다. 하나의 그러한 분석은 CellTiter-Glo™ 발광 세포 생활력 분석 (Luminescent Cell Viability Assay)이고, 이는 프로메가 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨)로부터 상업적으로 입수가능하다. 상기 분석은 대사적 활성 세포의 지표인 존재하는 ATP의 정량을 기초로 하여 배양액 내의 생존가능한 세포의 수를 결정한다 ([Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88], 미국 특허 6602677 참조). 분석은 자동화 고효율 스크리닝 (HTS)을 가능하게 하는 96- 또는 384-웰 포맷으로 수행할 수 있다 ([Cree et al. (1995) Anticancer Drugs 6:398-404] 참조). 분석 절차는 단일 시약 (CellTiter-Glo® 시약)을 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 수반한다. 이에 의해 세포 용해, 및 루시퍼라제 반응에 의해 생산된 발광 신호의 생성이 일어난다. 발광 신호는 존재하는 ATP의 양에 비례하고, 이는 배양액 내에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 정비례한다. 데이터는 발광측정기 또는 CCD 카메라 영상 장치에 의해 기록할 수 있다. 발광 출력은 상대 광 단위 (RLU)로서 표현한다.

[1128] 세포 증식을 위한 다른 분석은 미토콘드리아 리덕타제에 의한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드의 포르마잔으로의 산화를 측정하는 비색 분석인 "MTT" 분석이다. CellTiter-Glo™ 분석과 마찬가지로, 상기 분석은 세포 배양액 내에 존재하는 대사적 활성 세포의 수를 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63], 및 [Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882] 참조).

[1129] 한 측면에서, 항-CD79b 항체를 시험관 내에서 세포 사멸을 유도하는 그의 능력에 대해 시험한다. 세포 사멸 유도에 대한 분석은 당업계에 잘 알려져 있다. 일부 실시태양에서, 상기 분석은 예를 들어 요오드화프로피듐 (PI), 트리판 블루 ([Moore et al. (1995) Cytotechnology 17:1-11] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 표시되는

막 통합성의 상실을 측정한다. 예시적인 PI 흡수 분석에서, 세포를 10% 열-불활성화 FBS (하이클론 (Hyclone)) 및 2 mM L-글루타민을 보충한 둘베코 개질 이글 배지 (D-MEM):렘 F-12 (50:50) 내에서 배양한다. 따라서, 분석은 보체 및 면역 효과기 세포의 부재 하에 수행한다. 세포를 100 x 20 mm 디쉬 내에 디쉬 당 3×10^6 의 밀도로 접종하고, 철야 부착시킨다. 배지를 제거하고 신선한 배지 단독으로 또는 다양한 농도의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일 동안 인큐베이팅한다. 처리 후에, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 1200 rpm에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하고, 펠렛을 3 ml의 냉 Ca^{2+} 결함 버퍼 (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) 내에 재현탁시키고, 세포 덩어리를 제거하기 위해 35 mm의 스트레이너 마개가 있는 12 x 75 mm 튜브 (1 ml/튜브, 처리군 당 3개 튜브) 내로 분취한다. 이어서, 튜브에 PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣는다. 샘플은 FACSCAN® 유동 세포 측정기 및 FACSCONVERT® CellQuest 소프트웨어 (백톤 디킨슨)를 사용하여 분석한다. 이에 의해, PI 흡수에 의해 결정할 때 통계학상 유의한 수준의 세포 사멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체가 확인된다.

[1130]

한 측면에서, 항-CD79b 항체 또는 면역접합체를 시험관 내에서 세포사멸 (예정된 세포 사멸)을 유도하는 그의 능력에 대해 시험한다. 세포사멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 예시적인 분석은 아넥신 결합 분석이다. 예시적인 아넥신 결합 분석에서, 선행 문단에서 논의한 바와 같이 세포를 배양하고 디쉬 내에 접종한다. 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독으로 또는 0.001 내지 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 3일의 인큐베이션 기간 후에, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 원심분리하고, Ca^{2+} 결함 버퍼 내에 재현탁시키고, 선행 문단에 논의된 바와 같이 튜브 내로 분취한다. 이어서, 튜브에 표지된 아넥신 (예를 들어 아넥신 V-FITC) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣는다. 샘플을 FACSCAN™ 유동 세포 측정기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (비디 바이오사이언시즈)를 사용하여 분석한다. 이에 의해 대조군에 비해 통계학상 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체 또는 면역접합체가 확인된다. 세포사멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 다른 예시적인 분석은 게놈 DNA의 뉴클레오솜내 분해를 검출하기 위한 히스톤 DNA ELISA 비색 분석이다. 그러한 분석은 예를 들어, 세포 사멸 검출 ELISA 키트 (로슈 (Roche, 미국 캘리포니아주 팔로 알토))를 사용하여 수행할 수 있다.

[1131]

임의의 상기 시험관 내 분석에 사용하기 위한 세포는 자연적으로 CD79b를 발현하거나 CD79b를 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 그러한 세포는 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 CD79b를 과다발현하는 종양 세포를 포함한다. 그러한 세포는 또한 CD79b를 발현하는 세포주 (종양 세포주 포함), 및 정상적으로 CD79b를 발현하지 않지만 CD79b를 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다.

[1132]

한 측면에서, 항-CD79b 항체 또는 그의 면역접합체를 생체 내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험한다. 특정 실시태양에서, 항-CD79b 항체 또는 그의 면역접합체를 생체 내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험한다. 생체 내 모델 시스템, 예를 들어 이종이식편 모델을 그러한 시험을 위해 사용할 수 있다. 예시적인 이종이식편 시스템에서, 인간 종양 세포를 적합하게 면역손상시킨 비-인간 동물, 예를 들어 SCID 마우스에 도입한다. 본 발명의 항체 또는 면역접합체를 동물에게 투여한다. 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 항체 또는 면역접합체의 능력을 측정한다. 상기 이종이식편 시스템의 특정 실시태양에서, 인간 종양 세포는 인간 환자로부터의 종양 세포이다. 이종이식편 모델의 제조에 유용한 그러한 세포는 비제한적으로 BJAB-luc 세포 (루시페라제 리포터 유전자로 형질감염된 EBV-음성 버키트 림프종 세포주), Ramos 세포 (ATCC, CRL-1923), SuDHL-4 세포 (DSMZ, 독일 브라운쉬바이크, AAC 495), DoHH2 세포 ([Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991)], 및 [Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8: 1385-1391 (1994)] 참조), Granta-519 세포 ([Jadayel, D.M. et al., Leukemia 11(1):64-72 (1997)] 참조)를 포함하는 인간 백혈병 및 림프종 세포주를 포함한다. 특정 실시태양에서, 인간 종양 세포는 피하 주사에 의해 적합하게 면역손상시킨 비-인간 동물 내로 또는 이식에 의해 적합한 부위, 예를 들어 유지방체 (mammary fat pad) 내로 도입된다.

[1133]

2. 결합 분석 및 다른 분석

[1134]

한 측면에서, 항-CD79b 항체를 그의 항원 결합 활성에 대해 시험한다. 예를 들어, 특정 실시태양에서, 항-CD79b 항체를 세포의 표면 상에 발현된 CD79b에 결합하는 그의 능력에 대해 시험한다. 그러한 시험을 위해 FACS 분석을 사용할 수 있다.

[1135]

한 측면에서, CD79b에 대한 결합을 위해 뮤린 MA79b 항체, 인간화 MA79b.v17 항체 및/또는 인간화 MA79b.v18 및/또는 인간화 MA79b.v28 및/또는 인간화 MA79b.v32 항체와 경쟁하는 모노클로날 항체를 확인하기 위해 경쟁 분석을 사용할 수 있다. 특정 실시태양에서, 그러한 경쟁 항체는 뮤린 MA79b 항체, 인간화 MA79bv.17 항체 및/

또는 인간화 MA79b.v18 항체 및/또는 인간화 MA79b.v28 및/또는 인간화 MA79b.v32 항체가 결합하는 것과 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 예시적인 경쟁 분석은 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]에 제시된 것과 같은 통상적인 분석을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑하기 위한 상세한 예시적인 방법은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제시되어 있다. 2개의 항체가 각각 서로 다른 항체의 결합을 50% 이상 차단하는 경우에 2개의 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 말해진다.

[1136] 예시적인 경쟁 분석에서, 고정된 CD79b를, CD79b에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 무린 MA79b 항체, 인간화 MA79b.v17 항체 및/또는 인간화 MA79b.v18 항체 및/또는 인간화 MA79b.v28 및/또는 인간화 MA79b.v32) 및 CD79b에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험되는 제2 표지되지 않은 항체를 포함하는 용액 내에서 인큐베이팅한다. 제2 항체는 하이브리도마 상등액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 CD79b를, 제1 표지된 항체만을 포함하고 제2 표지되지 않은 항체를 포함하지 않는 용액 내에서 인큐베이팅한다. CD79b에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이팅한 후, 과잉의 결합되지 않은 항체를 제거하고, 고정된 CD79b와 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 CD79b와 회합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이것은 제2 항체가 CD79b에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁함을 나타낸다. 특정 실시태양에서, 고정된 CD79b는 세포의 표면 상에, 또는 그의 표면 상에 CD79b를 발현하는 세포로부터 수득한 막 제제 내에 존재한다.

[1137] 한 측면에서, 정제된 항-CD79b 항체는 N-말단 서열 결정, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화를 포함하고 이로 제한되지 않는 일련의 분석에 의해 추가로 특성 결정될 수 있다.

[1138] 한 실시태양에서, 본 발명은 항체를, 생체내 항체의 반감기가 중요하지만 특정 효과기 기능 (예를 들어, 보체 및 ADCC)에는 불필요하거나 유해한 많은 용도에 대한 바람직한 후보가 되게 하는, 모든 효과기 기능이 아니라 일부의 효과기 기능만을 보유하는 변형된 항체를 고려한다. 특정 실시태양에서, 목적하는 특성만이 유지되는 것을 보장하기 위해 항체의 Fc 활성을 측정한다. 시험관 내 및/또는 생체 내 세포독성 분석을 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석은 항체에 Fc γ R 결합이 결합되어 있지만 (따라서 ADCC 활성이 결합될 수 있음), 항체가 FcRn 결합능을 보유하는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 464페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 예는 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있다. 그러한 분석에 유용한 효과기 세포로는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로 또는 추가로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 결핍되는 지를 확인하기 위해 C1q 결합 분석을 수행할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다. 또한, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 결정을 수행할 수 있다.

[1139] 다음 실시예는 단지 예시적인 목적으로 제공되고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려고 의도되지 않는다.

[1140] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참조 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[1141] 실시예

[1142] 실시예에서 언급된 상업적으로 이용가능한 시약은 달리 지시하지 않으면 제조자의 지시에 따라 사용하였다. 실시예에서 사용된 항체는 상업적으로 이용가능한 항체를 포함하고, 항-CD79b (바이오메다 또는 비디바이오사이언스 또는 안셀로부터 구입된 항체), 항-CD79b (1993년 7월 20일에 HB11413으로 ATCC에 기탁된 하이브리도마로부터 생성된), 및 키메라 항-CD79b 항체 (1993년 7월 20일에 HB11413으로 ATCC에 기탁된 하이브리도마로부터 생성된 항체로부터의 가변 도메인을 포함하는)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 다음 실시예, 및 명세서 전체에서 ATCC 기탁 번호로 확인되는 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬처 컬렉션이다.

[1143] 실시예 1: 인간화 항-CD79b 항체의 생성

[1144] 잔기 번호는 카바트 (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))에 따른다. 단일 문자 아미노산 약어가 사용된다. DNA 다의성은 IUB 코드 (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)를 사용하여 나타낸다.

[1145] **A. 인간화 항-CD 79b 항체 이식편**

[1146] 다양한 인간화 항-CD79b 항체를 생성하였다. 무린 MA79b 항체 (MA79b)로부터의 VL 및 VH 도메인 (Roswell Park Cancer Institute; Okazaki et al., Blood, 81:84-94 (1993))을 인간 컨센서스 VL 카파 I (huKI) 및 인간 하위군 III 컨센서스 VH (huIII) 도메인과 정렬시켰다. HVR 이식편을 제조하기 위해, 인간 하위군 III 컨센서스 VH 도메인과 3개 위치, 즉 R71A, N73T, 및 L78A에서 상이한 엑셉터 VH 프레임워크 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992))를 사용하였다. 무린 MA79b (MA79b)로부터의 추가변 영역을 엑셉터 인간 컨센서스 프레임워크 내로 조작하여 MA79b의 직접 HVR-이식편 (본원에서 "MA79b 이식편" 또는 "MA79b-이식편" 또는 "MA79b-이식된 '인간화' 항체" 또는 "huMA79b-이식편"로서 칭함)를 생성하였다. VL 도메인에서, 다음 영역이 인간 컨센서스 엑셉터에 이식되었다: 위치 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) (도 7a-b). VH 도메인에서, 위치 26-35 (H1), 49-65 (H2) 및 93-102 (H3)가 이식되었다 (도 8a-b). 맥칼럼 (MacCallum) 등 (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996))은 항체 및 항원의 복잡한 결정 구조를 분석하였고, 중쇄의 위치 49, 93 및 94가 접촉 영역의 일부이고, 따라서 항체를 인간화시킬 때 HVR-H2 및 HVR-H3의 정의 내에 포함됨을 발견하였다.

[1147] 직접-이식편 변이체 (huMA79b-이식편)는 각각의 추가변 영역에 대해 별개의 올리고뉴클레오타이드를 사용하는, 파지 상에 디스플레이된 Fab로서 및 IgG로서 Kunkel 돌연변이 유발에 의해 생성하였다. 정확한 클론은 DNA 서열 결정에 의해 평가하였다.

[1148] **B. 인간화 항-CD79b 항체 이식편 변이체**

[1149] MA79b-이식된 "인간화" 항체의 추가변 영역 내에 돌연변이 다양성을 포함하는 항-CD79b 항체 이식편 변이체는 파지 라이브러리를 사용하여 생성하였다. 항-CD79b 항체 이식편 변이체는 HVR에서 단일 위치 변이 (도 9) 또는 HVR에서 다수 위치 변이 (도 10)를 포함하였다.

[1150] **C. 파지 선택**

[1151] 파지 선택을 위해, CD79b의 세포의 도메인 (huCD79b_{ecd}) (2 µg/ml)을 PBS 내에서 MaxiSorp 미세적정 플레이트 (넵크) 상에 4°C에서 철야로 고정시켰다. 플레이트를 적어도 1 h 동안 카제인 블로커 (Casein Blocker) (피어스)를 사용하여 차단시켰다. 파지를 배양 상등액으로부터 수거하고, 0.5% BSA 및 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS (PBSBT) 내에 현탁시켰다. 파지 라이브러리의 첨가 및 2 h 동안 파지 선택 후에, 미세적정 웰을 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS (PBST)로 광범하게 세척하여 결합되지 않은 파지를 제거하고, 결합된 파지는 웰을 100 mM HCl과 함께 30 min 동안 인큐베이팅함으로써 용출시켰다. 선택 엄격도는 PBST를 사용하는 세척의 횟수를 증가시킴으로써 또는 용출 전에 증가된 시간 동안 가용형 huCD79b_{ecd}와 함께 인큐베이팅함으로써 연속적인 선택 라운드 동안 증가시킬 수 있다.

[1152] 용출된 파지는 1 M Tris, pH 8로 중화시키고, XL1-Blue 세포 및 M13/K07 헬퍼 (helper) 파지를 사용하여 증폭시키고, 37°C에서 2YT, 50 µg/ml 카르베나실린 내에서 철야 성장시켰다. 농축을 평가하기 위해 표적 함유 웰로부터 용출된 파지의 역가를 비-표적 함유 웰로부터 회수된 파지의 역가와 비교하였다.

[1153] **D. Fab 생산 및 IgG 생산**

[1154] 친화도 측정을 위한 Fab 단백질을 발현시키기 위해, 정지 코돈을 중쇄와 파지 디스플레이 벡터 내의 g3 사이에 도입하였다. 클론을 이. 콜라이 34B8 세포 내로 형질전환시키고, 완전 C.R.A.P. 배지 내에서 30°C에서 성장시킨다 (Presta et al. Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). 세포를 원심분리에 의해 수거하고, PBS, 100 µM PMSF, 100 µM 벤즈아미딘, 2.4 mM EDTA 내에 현탁시키고, 고압유화기 (microfluidizer)로 파쇄하여 개방시켰다. Fab는 단백질 G 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[1155] 스크리닝 목적을 위해, IgG 변이체를 처음에 293 세포에서 생산하였다. VL 및 VH (25 µg)를 코딩하는 벡터를 FuGene 시스템을 사용하여 293 세포 내로 형질감염시켰다. 500 µl의 FuGene을 FBS를 함유하지 않는 4.5 ml의 DMEM 배지와 혼합하고, 실온에서 5 min 동안 인큐베이팅하였다. 각각의 사슬 (25 µg)을 상기 혼합물에 첨가하

고, 실온에서 20 min 동안 인큐베이팅한 후, 37°C에서 5% CO₂ 내에서 철야 형질감염을 위해 플라스크에 옮겼다. 다음날, 형질감염 혼합물을 함유하는 배지를 제거하고, 0.1 ml/L 미량 원소 (A0934) 및 10 mg/L 인슐린 (A0940)을 함유하는 23 ml PS04 배지로 교체하였다. 세포를 추가로 5일 동안 인큐베이팅한 후, 배지를 1000 rpm에서 5 min 동안 수거하고, 0.22 µm 저 단백질-결합 필터를 사용하여 멸균 여과하였다. 샘플은 125 ml의 배지당 2.5 ml 0.1% PMSF를 첨가한 후 4°C에서 저장할 수 있다.

[1156] **E. 친화도 결정 (Biacore 분석)**

[1157] MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 친화도 결정을 위해, 인간 CD79b의 세포외 도메인 (huCD79b_{ecd})을 CHO 세포 내에서 단독으로 또는 Fc 융합체 (huCD79b_{ecd}-Fc)로서 발현시키고, 통상적인 수단에 의해 정제하였다. 추가로, MA79b에 대한 에피토프를 함유하는 16 아미노산 펩티드 (ARSEDYRNPKGSACK) (서열 16)를 통상적인 수단에 의해 합성하였다.

[1158] MA79b 항체에 대한 에피토프 (도 19에서 "시험 펩티드"로 표지함)의 특성 결정은 2006년 8월 3일 출원된 미국 특허 출원 11/462,336에 개시된 바 있다. MA79b에 대한 에피토프는 막횡단 도메인에 먼 세포외 펩티드 영역 내에 위치하였고, 전장 및 말단 절단된 형태의 인간 CD79b로 존재하였고 (Cragg, Blood, 100(9): 3068-76 (2002)), 이것은 정상 및 악성 B 세포에서 설명되었다 ([Hashimoto, S. et al., Mol. Immunol., 32(9): 651-9 (1995)]; [Alfarano et al., Blood, 93(7): 2327-35 (1999)]). 말단 절단된 형태의 CD79b에는 전체 세포외 Ig-유사 도메인이 없다 (스플라이싱된 말단 절단된 형태의 CD79b 내에 존재하지 않는 세포외 Ig-유사 도메인은 도 19에서 네모로 표시한다).

[1159] 고정된 huCD79b_{ecd} 또는 huCD79b-Fc, 또는 MA79b에 대한 에피토프를 함유하는 16 아미노산 펩티드에 대한 MA79b, MA79b-이식된 "인간화" 항체 또는 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 Fab 및 IgG 변이체의 결합을 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정하였다. 친화도 결정은 Biacore™-2000을 사용하는 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다. 항원, huCD79b_{ecd} 또는 huCD79b-Fc를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8) 내에서 CM5 센서 칩 상에 고정시켰다 (약 50 - 200 RU). 큰 결합력 효과로 인해, 친화도 측정은 고정된 huCD79b_{ecd}의 양에 감수성이었다. 이러한 이유로 인해, 상이한 날에 실행된 샘플에 대해 결정된 친화도를 표준품으로서 나란히 실행한 MA79b에 대해 표준화시켰다. MA79b에 대한 에피토프를 함유하는 16 아미노산 펩티드 (ARSEDYRNPKGSACK) (서열 16)에 대한 결합을 측정한 실험에서, 비오틴화 펩티드를 스트렙타비딘 코팅된 센서 칩 상에 포획하였다 (약 20 RU). 정제된 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 (Fab 또는 IgG로서) (PBST 중에 0.5 내지 1000 nM의 2배 연속 희석액)를 30 µl/min의 유속으로 주입하였다. 각각의 샘플을 4분 회합 및 10분 해리를 이용하여 분석하였다. 각각의 주입 후에, 10 mM 글리신 (pH 1.7)을 사용하여 칩을 재생시켰다.

[1160] 결합 반응은 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 (Fab 또는 IgG로서) 유동 세포로부터 대조군 유동 세포를 뺀으로써 교정하였다. k_{on} 및 k_{off}의 동시 피팅의 1:1 랭그뮤어 모델을 운동학 분석을 위해 사용하였다.

[1161] **F. 결합 분석 (FACS 분석)**

[1162] MA79b-이식된 "인간화" 항체 또는 항체 변이체의 Fab 변이체의 결합을 추가로 결정하기 위해, DoHH-2 세포에 대한 Fab 및/또는 IgG 변이체의 결합을 FACS 분석을 이용하여 분석하였다. 추가로, BJAB-루시퍼라제 세포에 대한 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 결합을 FACS 분석을 이용하여 분석하였다.

[1163] MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 Fab 변이체 (MA79b-이식된 "인간화" 항체 (IgG 버전은 대조군으로서 사용됨))의 FACS 분석을 위해, DoHH-2 세포 (100 µl 부피 중 1 x 10⁶)를 먼저 1 µg의 본래의 마우스 항-CD79b 모노클로날 항체 (MA79b)와 함께 또는 상기 항체 부재 하에 30분 동안 인큐베이팅한 후, 1 µg의 개별 Fab 변이체 (또는 대조군 항체)를 첨가하였다. 모든 Fab 변이체는 카파 경쇄를 보유하고 DoHH-2 세포는 세포 표면 상에 카파 경쇄를 발현하지 않으므로, PE 접합된 마우스 항-인간 Ig, 카파 경쇄 (클론 G20-193, 비디 바이오사이언시즈 (미국 캘리포니아주 샌디에고))를 2차 검출 항체로서 사용하였다.

[1164] MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 IgG 변이체 (chMA79b의 IgG 버전은 대조군으로서 사용됨)의 추가의 FACS 분석을 위해, BJAB-루시퍼라제 세포의 1백만개의 세포당 1.0 µg, 0.1 µg 또는 0.01 µg의 항체를 적정하였다. PE 접합된 마우스 항-인간 Ig를 2차 검출 항체로서 사용하였다.

[1165] **G. 친화도 결정 (스캐처드 분석)**

[1166] HVR-L2 및 HVR-H3에서 변화를 갖는 IgG 변이체 (huMA79b L2/H3)의 결합을 추가로 결정하기 위해, 인간 CD79b 및 사이노몰거스 CD79b를 발현하는 BJAB 세포에 대한 요오드화 IgG 변이체의 결합을 분석하고, 스캐차드 분석을 수행하였다.

[1167] 스캐차드 분석을 위해, 0.5 nM I^{125} 표지된 MA79b 또는 huMA79b L2/H3을 사이노몰거스-CD79b 및 내인성 인간-CD79b를 안정적으로 발현하는 형질감염된 BJAB주의 존재 하에 50 내지 0.02 nM (12 단계 1:2 연속 희석액) 범위로 각각 비표지된 MA79b 또는 huMA79b L2/H3에 대해 경쟁시켰다. 4°C에서 4시간 인큐베이션 후에, 세포를 세척하고, 세포 펠렛 계수를 감마 계수기 (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer, 미국 매사추세츠주 왈탐))에 의해 판독하였다. 모든 지점은 삼중으로 수행하고, 10분 동안 계수하였다. New Ligand (제넨테크 인크., 미국 캘리포니아주 싸우스샌프란시스코) 프로그램을 이용하는 Kd 계산을 위해 평균 CPM을 사용하였다.

[1168] 결과 및 논의

[1169] A. 인간화 항-CD79b 항체 생성의 결과

[1170] 인간화 항-CD79b 항체의 생성을 위해 사용된 인간 엑셉터 프레임워크는 컨센서스 인간 카파 I VL 도메인, 및 인간 하위군 III 컨센서스 VH 도메인의 변이체를 포함한다. 변이체 VH 도메인은 인간 컨센서스로부터 3개의 변화를 갖는다: R71A, N73T 및 L78A. MA79b의 VL 및 VH 도메인을 인간 카파 I 및 하위군 III 도메인과 정렬시켰고; 각각의 HVR을 확인한 후, 인간 엑셉터 프레임워크 내로 이식시켜 파지 상에 Fab로서 디스플레이될 수 있는 HVR 이식편을 생성하였다 (도 7 및 8).

[1171] Fab로서 MA79b-이식편을 디스플레이하는 파지는 고정된 huCD79b_{ecd}에 결합되었다 (데이터를 제시하지 않는다). 그러나, huMA79b-이식편 서열이 IgG로서 발현될 때, huCD79b_{ecd}에 대한 그의 친화도의 FACS 분석에서는 결합 친화도가 100배 초과로 감소되었음을 나타내고 (데이터를 제시하지 않는다), Biacore 분석에서는 50배 초과로 손실을 나타냈다 (도 11).

[1172] 1. CDR 복구

[1173] 다음 서열 변화를 갖는 고정된 huCD79b_{ecd}에 결합할 수 있는 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체가 확인되었다.

[1174] VL에서 HVR을 표적으로 하는 유일한 서열 변화를 단일 위치 변화를 함유하는 라이브러리 내에서 관찰하였고, 도 9에 제시한다 (L1 돌연변이에 대해: Q27K (서열 17; SPL-2 돌연변이), (L2 돌연변이에 대해: L54R (서열 18), E55K (서열 19)), 및 (L3 돌연변이에 대해: E93S (서열 20; SPL-5 돌연변이), E93K (서열 21)).

[1175] L2, L3, H1 및 H3에서 HVR을 표적으로 하는 유일한 서열 변화를 다수 위치 변화를 함유하는 라이브러리 내에서 관찰하였고, 도 10에 제시한다 (L2 돌연변이에 대해: S52R, N53K, E55G 및 S56R (서열 22; L2-2 돌연변이); N53R (서열 23); S52R, N53K, E55G 및 S56N (서열 24); S52R, N53K, E55K 및 S56R (서열 25); S52R, N53Y, E55K 및 S56R (서열 26; L2-29 돌연변이); S52R, N53K 및 E55K (서열 27); S52R, N53K 및 E55A (서열 28); S52G, N53I, E55A 및 S56R (서열 29); S52R, N53K, E55R (서열 30); S52R, N53K 및 E55G (서열 31; L2-38 돌연변이); S52R, N53H, E55K 및 S56R (서열 32); A51S, S52R, N53Y, E55S 및 S56R (서열 33); A51G, N53K, E55L 및 S56R (서열 34); L54R 및 E55K (서열 35); N53K 및 E55G (서열 36); S52R, N53Y, E55R 및 S56R (서열 37); S52R, N53R, E55R 및 S56T (서열 38); S52R, N53R, E55G 및 S56R (서열 39); S52R, N53Q, L54R, E55K 및 S56R (서열 40); S52R, N53K, E55L 및 S56R (서열 41); S52R, N53K, E55K 및 S56N (서열 42); S52R, N53K, E55G 및 S56T (서열 43); S52R, N53K, E55G 및 S56G (서열 44); 및 S52R, N53K, E55A 및 S56R (서열 45)), (L3 돌연변이에 대해: E93A (서열 46); E93Q (서열 47); 돌연변이 없음 (서열 48); E93D (서열 49); E93L (서열 50); Q89N, Q90N, E93G 및 T97N (서열 51); Q90P, S91D, D94A 및 L96R (서열 52); Q89D, S91R 및 E93A (서열 53)), (H1 돌연변이에 대해: T28P, S30T, S31R 및 E35S (서열 54); T28P, S30R 및 E35Q (서열 55); T28P, S30T 및 E35N (서열 56); T28P, S30T, S31R 및 E36N (서열 57; H1-6 돌연변이); S30N, S31R 및 E35N (서열 58); T28S 및 S30K (서열 59); G26P, T28S, F29L, S30C, S31T, W33F 및 E35D (서열 60); T28Y 및 S30T (서열 61); T28P, S30G, S31R, I34V 및 E35N (서열 62); S30K 및 S31K (서열 63); T28P, S30T 및 E35Q (서열 64); T28P, S30R 및 S31R (서열 65); T28P, F29V, S30G, S31R 및 E35S (서열 66); T28P, S30N, S31R 및 E35N (서열 67; H1-1 돌연변이); T28G, S30T 및 E35S (서열 68); S30T, I34L 및 E35S (서열 69); S30T (서열 70); S31G 및 E35N (서열 71); S30R, S31R 및 E35N (서열 72); T28S, S30R 및 E35N (서열 73); T28S, S30R, S31R 및 E35N (서열 74); T28S, S30R 및 S31R (서열 75); T28S, S30P, I34L 및 E35Q (서열 76); T28P, S30T 및 S31R (서열

77); T28P 및 S31G (서열 78); T28P, S30R 및 E35S (서열 79); T28P, S30R 및 E35N (서열 80); T28P, S30R 및 S31G (서열 81); T28P, S30N 및 S31R (서열 82); T28P, S30N, S31G 및 E35N (서열 83); T28N, F29V, I34L 및 E35S (서열 84); Y27F, T28P, S30T 및 E35S (서열 85); 및 Y27F, T28P, S30N, S31R 및 E35N (서열 86)) 및 (H3 돌연변이에 대해: V98I 및 F100L (서열 87; H3-12 돌연변이); 돌연변이 없음 (서열 88); Y99K 및 F100L (서열 89); F100L (서열 90); V98I (서열 91); V98F, Y99C 및 F100L (서열 92); F100L (서열 93); V98I, Y99R 및 F100L (서열 94; H3-10 돌연변이); V98I, Y99K 및 F100L (서열 95); V98I 및 Y99R (서열 96); V98I (서열 97); D101S (서열 98); Y99V 및 F100L (서열 99); Y99R 및 F100L (서열 100); Y99R (서열 101); Y99F 및 F100L (서열 102); V98I 및 F100L (서열 103); V98I (서열 104); V96R, Y99C 및 F100L (서열 105); 및 V96I (서열 106)).

[1176] 선택된 클론을 FACS에 의한 분석을 위해 Fab로서, 및 Biacore 및 스캐차드에 의한 추가의 분석을 위해 IgG로서 재설정하였다.

[1177] a. 친화도 결정 (Biacore 분석)

[1178] Biacore 분석을 보여주는 도 11에 도시된 바와 같이, 상기 CDR-복구 방법은 MA79b-이식된 "인간화" 항체의 친화도를 개선하는 많은 개별적인 서열 변화를 확인하였다. 표면 플라즈몬 공명 분석은 단일 HVR 변화를 갖는 시험된 변이체는 어느 것도 MA79b에 유사한 친화도를 갖지 않았지만, HVR-L2 및 HVR-H3에서 확인된 변화들의 조합 (MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 L2/H3; 본원에서 huMA79b L2/H3로도 칭함)은 Biacore 분석에 의해 결정할 때 고정된 huCD79b_{ecd} 또는 huCD79b_{ecd}-Fc, 또는 MA79b에 대한 에피토프를 함유하는 16 아미노산 펩티드에 결합할 때 MA79b와 유사한 친화도를 갖는 변이체를 생성시켰음 (도 11)을 보여주었다.

[1179] 항원 (huCD79b_{ecd}-Fc)에 대한 MA79b의 단량체성 결합 (Fab) 대 이량체성 결합 (IgG)의 분석 (도 11, 제1열, Fab를 IgG 컬럼에 비교함)에서는 MA79b 내에 존재하는 100배 결합력 성분이 친화도 개선된 변이체에서 결여될 수 있음을 제안하였다. 구체적으로, MA79b에 비해 단량체성 결합에서 5배 개선을 나타내는 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 L2-2 (본원에서 huMA79b L2-2로도 칭함)에서 (도 11, 제1 및 3열, Fab 컬럼을 비교함), huMA79b L2-2를 IgG로서 재설정할 때 명백한 친화도가 얻어지지 않는다 (도 11, 제4열, Fab를 IgG 컬럼과 비교함). 추가로, 처음의 MA79b HVR 이식된-"인간화" 항체 (huMA79b 이식편)는 결합에서 상기 결합력 성분의 상실을 나타낸다 (도 11, 제2열, Fab를 IgG 컬럼에 비교함). 결합력을 통해 결합을 향상시키는 능력은 세포 표면 항원에 결합하는데 바람직할 수 있다.

[1180] b. 친화도 결정 (스캐차드 분석)

[1181] 스캐차드 분석에 의해 평가할 때, 상기 CDR-복구 방법은 MA79b-이식된 "인간화" 항체의 친화도를 개선하는 많은 개별적인 서열 변화를 확인하였다. 구체적으로, 세포 결합 분석에서는 사이노물거스 CD79b 및 내인성 인간 CD79b를 안정적으로 발현하는 BJAB 세포에의 결합에 대한 MA79b 및 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 L2/H3 (huMA79b L2/H3) (IgG로서 재설정된)의 친화도는 스캐차드 분석에 의해 결정할 때 각각 0.63 nM (MA79b; K_d = 0.63±0.14 nM) 및 0.52 nM (huMA79b L2/H3; K_d = 0.52±0.1 nM)의 K_d 값을 가졌음을 보여주었다 (데이터를 제시하지 않는다).

[1182] c. 결합 결정 (FACS 분석)

[1183] FACS 분석에 의해 평가할 때, 상기 CDR-복구 방법은 DoHH-2 세포에 대한 MA79b-이식된 "인간화" 항체 (huMA79b 이식편)의 결합을 개선하는 많은 개별적인 서열 변화를 확인하였다 (데이터를 제시하지 않는다). 구체적으로, DoHH-2 세포에 대한 SP 및 6 SR 라이브러리로부터 확인된 Fab 변이체 (L2-2, H3-10 및 H1-1 돌연변이)의 FACS 분석에서는 DoHH-2 세포에 대한 Fab 변이체 및 huMA79b 이식편 (IgG로서 설정됨)의 결합을 보여주었다 (데이터를 제시하지 않는다). 추가로, Fab 변이체의 FACS 분석에서는 DoHH-2 세포에 대한 Fab 변이체의 결합이 무린 항-CD79b 모노클로날 항체 (MA79b)와 함께 예비-인큐베이션에 의해 차단되었음을 보여주었다 (데이터를 제시하지 않는다).

[1184] 2. 프레임워크 복구

[1185] huMA79b L2/H3 변이체의 HVR-L2 내로 도입된 HVR 서열 변화는 임의의 인간 생식계열에서 관찰된 것과 근본적으로 상이하였다. DM1에 접합될 때 huMA79b L2/H3 변이체는 생체내 마우스 이종이식편 모델에서 종양 성장을 억제하는데 효과적인 것으로 관찰되었다 (표 9). 항원에 대한 huMA79b L2/H3 변이체의 단량체성 결합 (Fab) 대 이량체성 결합 (IgG)의 분석에서는 결합력의 상실을 보여주었으므로 (도 11), 프레임워크 복구를 아래 설명된

바와 같이 수행하였다.

- [1186] 이량체성 항원 결합에서 프레임워크 위치의 역할을 탐구하기 위해, 잠재적으로 중요한 무린 프레임워크 위치를 MA79b HVR-이식된 "인간화" 항체 (huMA79b 이식편) 내로 포함시킨 "모든 프레임워크" 위치 변이체를 제작하였다. 임의의 HVR 변화가 없는 상기 변이체 (도 12에서 "모든 프레임워크"로서 칭함)는 Biacore 분석 및 스캐차드 분석에 의해 평가할 때 키메라 MA79b 항체 (chMA79b)에 유사한 이량체성 결합 친화도를 가졌다 (도 12).
- [1187] 고친화도의 이량체성 결합을 유지하기 위해 필요한 프레임워크 위치의 최소 세트를 결정하기 위해, 위치 4 및/또는 47 (VL) 및/또는 위치 47, 48, 67, 69, 71, 73, 74, 78 및/또는 80 (VH)에서 무린 프레임워크 잔기를 포함하는 IgG 변이체를 생성하였다 (도 12). 무린 프레임워크 잔기는 도 7a-b (서열 10) 및 도 8a-b (서열 14)에 제시된다. VL에서 프레임워크 위치 47, 및 VH에서 75 및 80이 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 17 (huMA79b.v17)에 의해 입증되는 바와 같이 불필요한 것으로 밝혀졌다 (도 12, 17로 표지한 열).
- [1188] VL에서 위치 4, 및 VH에서 위치 48, 67, 69, 71, 73 및 78에서 무린 프레임워크 잔기를 포함하고, V98I, Y99R 및 F100L을 포함한 HVR-H3에서 변화를 추가로 포함하는 (도 12에서 "H3-10"으로 칭하고 위에서 H3-10 돌연변이로 칭함) MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 18 (MA79b.v18; 도 12, 18로 표지한 열)은 변이체 17 (도 12, 17로 표지한 열)에 비교할 때 이량체성 결합에서 추가의 2배 개선 (도 12, 28로 표지한 열)을 보였다.
- [1189] 잠재적인 제조 문제를 피하기 위해, MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 HVR-L1에서 잠재적인 이소-아스파르트산 형성 부위 (Asp-Gly)를, D28을 Glu (글루탐산)으로 전환시킴으로써 제거하였다 (D28E; 변이체 28 참조; 본원에서 "huMA79b.v28"로도 칭함; 도 12, 28로 표지한 열). D28에서 Ser (세린)으로의 치환 (D28E; 변이체 32 참조; 본원에서 "huMA79b.v32"로도 칭함; 도 12, 32로 표지한 열)을 포함한 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 VL에서 안정성을 위한 다른 치환이 또한 허용되었다.
- [1190] (1) VL에서 위치 4, 및 VH에서 48, 67, 69, 71, 73 및 78에서 무린 프레임워크 잔기를 포함하고, (2) V98I, Y99R 및 F100L을 포함한, HVR-H3에서 변화를 추가로 포함하고 (도 12에서 "H3-10"으로 칭하고 위에서 H3-10 돌연변이로 칭함), (3) HVR-L1에서 변화 (D28E, 상기 설명됨)를 또한 더 포함하는 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 28 (huMA79b.v28; 도 12, 28로 표지한 열)을 Biacore 분석을 통해 특성 결정하였다.
- [1191] (1) VL에서 위치 4, 및 VH에서 48, 67, 69, 71, 73 및 78에서 무린 프레임워크 잔기를 포함하고, (2) V98I, Y99R 및 F100L을 포함한, HVR-H3에서 변화를 추가로 포함하고 (도 12에서 "H3-10"으로 칭하고 위에서 H3-10 돌연변이로 칭함), (3) 또한 HVR-L1에서 변화 (D28S, 상기 설명됨)를 또한 더 포함하는 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 32 (MA79b.v32; 도 12, 32로 표지한 열)을 Biacore 분석을 통해 특성 결정하였다.
- [1192] a. 친화도 결정 (Biacore 분석)
- [1193] Biacore 분석을 보여주는 도 12에 도시된 바와 같이, 상기 프레임워크-복구 방법은 huCD79b_{ecd}에 대한 MA79b-이식된 "인간화" 항체의 친화도를 개선하는 많은 개별적인 서열 변화를 확인하였다. 표면 플라즈몬 공명 분석은 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 28 (huMA79b.v28; VL에서 위치 4, VH에서 위치 48, 67, 69, 71, 73 및 78에서 무린 프레임워크, 및 HVR-H3 (V98I, Y99R 및 F100L)에서 H3-10 돌연변이 (또한 상기 설명됨), 및 HVR-L1에서 D28E 돌연변이 (안정성을 위해, 상기 설명 참조)를 갖는; 도 12, 28로 표지한 열) 및 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 (huMA79b.v32; VL에서 위치 4, VH에서 위치 47, 48, 67, 69, 71, 73 및 78에서 무린 프레임워크, 및 HVR-H3 (V98I, Y99R 및 F100L)에서 H3-10 돌연변이 (또한 상기 설명됨) 및 HVR-L1에서 D28S 돌연변이 (안정성을 위해, 상기 설명 참조)를 갖는; 도 12, 32로 표지한 열)는 Biacore 분석에 의해 결정할 때 고정된 huCD79b_{ecd}에 결합될 때 키메라 MA79b 항체 (chMA79b)와 동등한 친화도를 가졌다.
- [1194] b. 친화도 결정 (스캐차드 분석)
- [1195] Biacore 분석에 유사한 스캐차드 분석에 의해 평가할 때, 상기 프레임워크-복구 방법은 MA79b-이식된 "인간화" 항체 (huMA79b 이식편)의 친화도를 개선하는 많은 개별적인 서열 변화를 확인하였다. 세포 결합 분석은 사이노물거스 CD79b 및 내인성 인간 CD79b를 안정적으로 발현하는 BJAB 세포에의 결합에 대한 MA79b, MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 28 (huMA79b.v28; 도 12 참조, 28로 표지한 열) (IgG로서 재설정된), 및 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 32 (huMA79b.v32; 도 12 참조, 32로 표지한 열)의 친화도가 스캐차드 분석에 의해 결정할 때 각각 0.63 nM (MA79b; Kd = 0.63±0.14 nM), 0.44 nM (huMA79b.v28; Kd = 0.44±0.04 nM), 및 0.24 nM (huMA79b.v32; Kd = 0.24±0.02 nM)의 Kd 값을 가졌음을 보여주었다 (데이타를 제시하지 않는다).

- [1196] c. 결합 결정 (FACS 분석)
- [1197] FACS 분석에 의해 평가할 때, 상기 프레임워크-복구 방법은 BJAB-루시퍼라제 세포에 대한 MA79b-이식된 "인간화" 항체 (huMA79b 이식편)의 결합을 개선하는 많은 개별적인 서열 변화를 확인하였다 (데이터를 제시하지 않는다). 구체적으로, BJAB-루시퍼라제 세포에 대한 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 (변이체 huMA79b.v28 및 huMA79b.v32)의 IgG 변이체의 FACS 분석에서는 BJAB-루시퍼라제 세포에 대한 결합을 보여주었다 (데이터를 제시하지 않는다).
- [1198] B. 인간화 항-CD79b 항체 생성의 논의
- [1199] 인간 컨센서스 카파 I VL 및 하위군 III VH (A71, T73 및 A78) 내로 6개의 뮤린 MA79b HVR (위치 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) 및 93-102 (H3)로서 지정됨)의 이식편으로부터 출발하여, 결합 친화도를 개선하는 HVR 1-6에서의 변화를 확인하기 위해 CDR 복구를 사용하였다. 도 10 및 11에 확인된 HVR 서열 변화 또는 이들 변화의 조합은 MA79b에 유사한 친화도를 갖는 MA79b의 인간화 변이체를 생성시켰다.
- [1200] 별법으로, huMA79b 이식편 (VH의 71, 73 및 78에서 뮤린 프레임워크 잔기를 포함하는) (도 12; MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 17 (huMA79b.v17))에 대한 VL에서 위치 4, 및 VH에서 48, 67, 및 69에서 프레임워크의 부가에 의한 이량체성 결합 결합력을 재포획하기 위해 프레임워크 복구를 사용하였다. huCD79b_{ecd} 항원에 대한 이들 프레임워크 돌연변이 변이체의 친화도는 HVR-H3에서 3개의 변화의 첨가에 의해 더욱 향상되었다: V98I, Y99R 및 F100L (도 12; MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 18 (huMA79b.v18)). HVR-L1 내의 잠재적인 이소-아스파르트산 형성 부위를 D28E 돌연변이를 이용하여 제거하였다 (도 12; MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 28 (huMA79b.v28)).
- [1201] 실시예 2: 항-CD79b 항체 약물 접합체 (ADC)의 생성
- [1202] MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 IgG 변이체의 효능을 시험하기 위해, MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체를 약물, 예를 들어 DM1에 접합시켰다. DM1에 접합된 변이체는 HVR-L2 및 HVR-H3에서 변화를 갖는 변이체 (huMA79b L2/H3), huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 및 huMA79b.v32를 포함하였다.
- [1203] 항-CD79b 항체에 대한 항체 약물 접합체 (ADC)의 생성을 위해 사용되는 약물은 메이탄시노이드 DM1 및 돌라스타틴10 유도체 모노메틸아우리스타틴 E (MMAE) 및 모노메틸아우리스타틴 F (MMAF)를 포함하였다 (US 2005/0276812; US 2005/0238649; [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)], 이들은 모두 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). ADC의 생성에 유용한 링커는 DM1에 대해 BMPEO, SPP 또는 SMCC (본원에서 "MCC"로도 칭함), 및 MMAE 및 MMAF에 대해 MC 또는 MC-vc-PAB이다. DM1에 대해, 항체는 링커 시약 SMCC를 사용하여 리신의 ε-아미노기를 통해 DM1의 티오기에 연결되었다. 별법으로, DM1에 대해, 항체는 SPP 링커를 사용하여 리신의 ε-아미노기를 통해 DM1에 연결되었다. SPP (N-숙신이미드 4-(2'-피리디디티오) 펜타노에이트)는 리신의 엡실론 아미노기와 반응하여 단백질 상에 반응성 2-피리디디 디술피드 링커를 남긴다. SPP 링커를 사용하면, 유리 술폰히드랄 (예를 들어 DM1)과 반응시에, 피리디디기가 교체되어, 환원가능 디술피드 결합을 통해 부착된 DM1을 남긴다. SPP 링커를 통해 부착된 DM1은 환원 조건 (즉, 예를 들어 세포 내에서) 하에 방출되는 반면, SMCC 링커를 통해 부착된 DM1은 환원 조건에서 절단에 대해 저항성이다. 추가로, SMCC-DM1 ADC는 ADC가 내재화되고 라이소좀에 대해 표적화하여 세포 내부에서 효과적인 항유사분열제인 리신-N^ε-DM1을 방출시킨다면 세포 독성을 유도하고, 세포로부터 방출될 때, 리신-N^ε-DM1은 무독성이다 (Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426-4433 (2006)). MMAE 및 MMAF에 대해, 항체는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린 (vc)-p-아미노벤질 옥시카르보닐 (MC-vc-PAB)에 의해 시스테인을 통해 MMAE 또는 MMAF에 연결되었다. MMAF에 대해, 항체는 별법으로 말레이미도카프로일 (MC) 링커에 의해 시스테인을 통해 MMAF에 연결되었다. MC-vc-PAB 링커는 세포간 프로테아제, 예를 들어 카텝신 B에 의해 절단가능하고, 절단될 때 유리 약물을 방출하는 반면 (Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003)), MC 링커는 세포내 프로테아제에 의한 절단에 저항성이다.
- [1204] SMCC 및 DM1을 사용하는 항-CD79b에 대한 항체 약물 접합체 (ADC)는 US 2005/0276812에 설명된 절차에 유사하게 생성하였다. 항-CD79b 정제된 항체를 50 mM 인산칼륨 및 2 mM EDTA를 함유하는 용액 (pH 7.0) 내로 버퍼-교환하였다. SMCC (피어스 바이오테크놀로지, 미국 일리노이주 록포드)를 디메틸아세트아미드 (DMA)에 용해시키고, 항체 용액에 첨가하여 최종 SMCC/Ab 몰비를 10:1로 하였다. 반응을 3시간 동안 실온에서 혼합하면서 진행시켰다. SMCC-변형된 항체를 후속적으로 150 mM NaCl 및 2 mM EDTA를 함유하는 35 mM 시트르산나트륨 (pH 6.0) 내

에 평형화시킨 GE Healthcare HiTrap 탈염 컬럼 (G-25) 상에서 정제하였다. DMA 내에 용해시킨 DM1을 SMCC 항체 제제 내에 첨가하여 10:1의 DM1 대 항체의 물비를 제공하였다. 반응을 4-20 hr 동안 실온에서 혼합하면서 진행시켰다. DM1-변형된 항체 용액을 20 부피의 PBS로 투석여과하여 미반응된 DM1을 제거하고, 멸균 여과하고, 4℃에서 저장하였다. 대개, 상기 공정을 통해 항체의 40-60% 수율을 달성하였다. 제제는 겔 여과 및 레이저 광 산란에 의해 평가할 때 대체로 >95% 단량체성이었다. DM1은 252 nm에서 흡수 최대치를 가지므로, 항체에 결합된 약물의 양은 252 및 280 nm에서 시차 흡광 측정에 의해 결정할 수 있다. 대개, 약물 대 항체 비는 3 내지 4이었다.

[1205]

SPP-DM1 링커를 사용하는 본원에 기재된 항-CD79b 항체에 대한 항체 약물 접합체 (ADC)는 US 2005/0276812에 설명된 절차에 유사하게 생성할 수 있다. 항-CD79b 정제된 항체를 50 mM 인산칼륨 및 2 mM EDTA를 함유하는 용액 (pH 7.0) 내로 버퍼-교환하였다. SPP (이뮤노젠 (Immunogen))를 DMA에 용해시키고, 항체 용액에 첨가하여 최종 SPP/Ab 물비를 약 10:1로 하였고, 여기서 정확한 비는 항체의 목적하는 약물 로딩에 의존적이다. 10:1 비가 대체로 약 3-4의 약물 대 항체 비를 생성시킬 것이다. SPP를 3-4시간 동안 실온에서 혼합하면서 반응시켰다. SPP-변형된 항체를 후속적으로 150 mM NaCl 및 2 mM EDTA를 함유하는 35 mM 시트르산나트륨 (pH 6.0) 또는 인산염 완충 염수 (pH 7.4) 내에 평형화시킨 GE Healthcare HiTrap 탈염 컬럼 (G-25) 상에서 정제하였다. DM1을 DMA에 용해시키고, SPP 항체 제제에 첨가하여 10:1의 DM1 대 항체의 물비로 하고, 이는 항체 상의 이용가능한 SPP 링커에 비해 3-4배 몰과량을 생성시킨다. DM1과의 반응을 4-20 hr 동안 실온에서 혼합하면서 진행시킨다. DM1-변형된 항체 용액을 20 부피의 PBS로 투석여과하여 미반응된 DM1을 제거하고, 멸균 여과하고, 4℃에서 저장하였다. 대개, 상기 공정을 사용하여 40-60% 또는 그 이상의 항체의 수율을 달성하였다. 항체-약물 접합체는 겔 여과 및 레이저 광 산란에 의해 평가할 때 대체로 >95% 단량체성이다. 결합된 약물의 양은 SMCC-DM1 접합체의 제조 (상기 설명됨)에 대해 설명된 바와 같이 252 및 280 nm에서 시차 흡광 측정에 의해 결정한다.

[1206]

MC-MMAF, MC-MMAE, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE 또는 MC-val-cit (vc)-PAB-MMAF 약물 링커를 사용하는 본원에 기재된 항-CD79b 항체에 대한 항체 약물 접합체 (ADC)는 또한 US 2005/0238649에 설명된 절차에 유사하게 생성할 수 있다. 정제된 항-CD79b 항체를 500 mM 붕산나트륨 및 500 mM 염화나트륨 (pH 8.0)에 용해시키고, 과잉의 100 mM 디티오프레이톨 (DTT)로 추가로 처리한다. 37℃에서 약 30분 동안 인큐베이팅한 후, 버퍼를 세파덱스 G25 수지 상에서 용출에 의해 교환시키고, 1 mM DTPA를 함유하는 PBS로 용출시킨다. 티올/Ab 값은 용액의 280 nm에서 흡광도로부터 환원된 항체 농도, 및 DTNB (알드리치 (Aldrich, 미국 위스콘신주 밀워키))와의 반응 및 412 nm에서 흡광도 결정에 의한 티올 농도를 결정함으로써 검토한다. 환원된 항체를 얼음 상에 냉각시킨 PBS에 용해시킨다. DMSO 중 약물 링커, 예를 들어 MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE를 아세트니트릴 및 물에 용해시키고, PBS 중의 냉각시킨 환원된 항체에 첨가한다. 1시간 인큐베이션 후에, 과잉의 말레이미드를 첨가하여 반응을 켜치고, 임의의 미반응된 항체 티올기를 캐핑한다. 반응 혼합물을 원심분리 초여과에 의해 농축시키고, 항체 약물 접합체를 정제하고, PBS 중에서 G25 수지를 통한 용출에 의해 탈염시키고, 멸균 조건 하에 0.2 µm 필터를 통해 여과시키고, 저장을 위해 동결시킨다.

[1207]

항체 약물 접합체 (본원에 기재된 항-CD79b 항체를 사용하는)를 분석 배지 내에 2 x 10 µg/ml로 희석하였다. 접합체를 가교링커 SMCC와 연결시켰다 (메이탄시노이드 DM1 독소에 대한 SPP에 대해 별도의 디술폰드 링커가 사용될 수 있다) (US 2005/0276812 및 US 2005/0238649 참조). 추가로, 접합체는 MC-발린-시트룰린 (vc)-PAB 또는 MC를 사용하여 돌라스타틴10 유도체, 모노메틸아우리스타틴 E (MMAE) 독소 또는 모노메틸아우리스타틴 F (MMAF) 독소에 연결될 수 있다 (2005년 5월 31일자 출원된 미국 특허 출원 11/141,344, 및 2004년 11월 5일자 출원된 미국 특허 출원 10/983,340 참조). 음성 대조군은 HERCEPTIN® (트라스투주맵) (항-HER2) 기반 접합체 (SMCC-DM1 또는 SPP-DM1 또는 MC-vc-MMAE 또는 MC-vc-MMAF)를 포함하였다. 양성 대조군은 접합체 로딩 용량에 동등한 유리 L-DM1을 포함할 수 있다. 샘플을 볼텍싱하여 희석에 앞서 균질한 혼합물을 보장하였다.

[1208]

약물 접합을 위한 항-CD79b 항체는 키메라 MA79b 항체 (chMA79b) 및 huMA79b L2/H3 항체 변이체 및 본원에 기재된 huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 및 huMA79b.v32 (실시에 1 참조)를 포함하였다. 접합을 위한 추가의 항체는 본원에 기재된 임의의 항체를 포함할 수 있다 (실시에 1 참조).

[1209]

실시에 3: 생체 내 중앙 세포 사멸 분석

[1210]

A. 이종이식편

[1211]

HVR-L2 및 HVR-H3에서 변화를 갖는 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 (huMA79b L2/H3)의 IgG 변이체의 효능을 시험하기 위해, huMA79b L2/H3 변이체를 DM1에 접합시키고, 마우스에서 중앙에 대한 접합된 변이체의 효과를

분석하였다.

[1212] 구체적으로, RAMOS 세포, BJAB 세포 (t(2;8)(p112;q24) (IGK-MYC) 전위, 돌연변이된 p53 유전자를 함유하고, 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 음성인 버키트 림프종 세포주) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), Granta 519 세포 (시클린 D1 (BCL1)의 과다발현을 유발하는 t(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH) 전위를 함유하고, P16INK4B 및 P16INK4A 결실을 함유하고, EBV 양성인 외 투층 세포 림프종 세포주) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), U698M 세포 (림프모구 림프육종 B 세포주; (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)) 및 DoHH2 세포 (Ig 중쇄에 의해 추진된 Bcl-2의 과다발현을 유발하는 여포성 림프종의 전위 특징 t(14;18)(q32;q21)을 함유하고, P16INK4A 결실을 함유하고, t(8;14)(q24;q32) (IGH-MYC) 전위를 함유하고, EBV 음성인 여포성 림프종 세포주) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001))를 포함한, 다중 이종이식편 모델에서 종양을 퇴행시키는 항체의 능력을 검사하였다.

[1213] MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체의 효능의 분석을 위해, 암컷 CB17 ICR SCID 마우스 (6-8주령, 찰스 리버스 래보라토리스 (Charles Rivers Laboratories, 미국 캘리포니아주 홀리스터)로부터)에게 2×10^7 BJAB-루시퍼라제 세포 또는 Granta-519 세포를 CB17 ICR SCID 마우스의 옆구리 내에 주사를 통해 피하 접종하고, 이종이식편 종양을 평균 200 mm^2 으로 성장시켰다. 제0일은 아래에 구체적으로 달리 지시하지 않으면 종양이 평균 200 mm^2 로 되고 제1/또는 유일 용량의 치료제를 투여한 날을 나타낸다. 종양 부피는 캘리퍼스 (calipers)를 사용하여 측정된 2개 치수에 기초하여 계산하고, $V = 0.5a \times b^2$ (여기서, a 및 b는 각각 종양의 긴 직경과 짧은 직경이다)의 식에 따라 mm^3 으로 표현하였다. 각각의 실험군으로부터 수집한 데이터는 평균 $\pm$ SE로서 표현하였다. 10마리 마우스의 군을 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 또는 대조군 항체-약물 접합체로 $50 \mu\text{g}$ 내지 $210 \mu\text{g}$ 의 항체-연결된 약물/ m^2 마우스 ($\sim 1\text{-}4 \text{ mg/kg}$ 의 마우스에 대응함)의 단일 정맥내 (i.v.) 용량으로 처리하였다. 종양을 실험 내내 매주 1 또는 2회 측정하였다. 마우스의 체중을 실험 내내 매주 1 또는 2회 측정하였다. 종양 부피가 3000 mm^3 에 도달하기 전에, 또는 종양이 임박한 궤양형성의 징후를 보일 때 마우스를 안락사시켰다. 모든 동물 프로토콜은 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee)에서 승인받았다.

[1214] 사용된 항체와 독소 사이의 링커는 DM1에 대해 티오에테르 가교링커 SMCC이었다. 추가의 링커는 DM1에 대해 디술피드 링커 SPP 또는 티오에테르 가교링커 SMCC, 또는 모노메틸아우리스타틴 E (MMAE) 또는 모노메틸아우리스타틴 F (MMAF)에 대해 말레이미드 성분 및 파라-아미노벤질카르바모일 (PAB) 자가 희생적 성분을 갖는 MC 또는 MC-발린-시트룰린(vc)-PAB 또는 (발린-시트룰린 (vc)) 디펩티드 링커 (시약)을 포함할 수 있다. 사용된 독소는 DM1이었다. 추가의 독소는 MMAE 또는 MMAF를 포함할 수 있다.

[1215] 본 실험을 위한 CD79b 항체는 2006년 8월 3일 출원된 미국 특허 출원 11/462,336에 기재된 키메라 MA79b (chMA79b) 항체뿐만 아니라 본원에 기재된 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 (실시예 1A 참조)를 포함하였다. 추가의 항체는 상업적으로 이용가능한 항체, 예를 들어 항-CD79b 항체, 및 1993년 7월 20일자로 ATCC에 HB11413으로 기탁된 하이브리도마로부터 생성된 MA79b 모노클로날 항체를 포함할 수 있다.

[1216] 음성 대조군은 항-HER2 (HERCEPTIN® (트라스투주맵)) 기반 접합체 (SMCC-DM1)를 포함하였다.

[1217] **B. 결과**

[1218] **1. BJAB-루시퍼라제 이종이식편**

[1219] 표 9에 제시된 약물 접합체 및 투여량을 사용한 35일의 시간 과정에서, DM1에 접합된 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 L2/H3 (huMA79b L2/H3 변이체) (IgG로서 재설정된) 및 키메라 항-CD79b 항체 (chMA79b) (각각 huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 및 chMA79b-SMCC-DM1)는 음성 대조군, HERCEPTIN® (트라스투주맵)-SMCC-DM1 (항-HER2-SMCC-DM1)에 비해 BJAB-루시퍼라제 종양을 갖는 SCID 마우스에서 종양 성장의 억제를 보였다. ADC는 모든 ADC 및 대조군에 대해 단일 용량 (표 9에 지시된 바와 같이)으로 제0일에 투여하였다. 구체적으로, huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 항체 (IgG로서 재설정된) 및 chMA79b-SMCC-DM1은 종양 성장을 유의하게 억제하였다 (도 20). 추가로, 표 9에서, 시험된 마우스의 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm^3 로 떨어진 경우)을 보이는 마우스의 수를 표시한다.

표 9

투여된 항체 (처리)	PR	CR	투여량 약물- DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물/Ab)
대조군 항-HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	100	2	3.3
chMA79b-SMCC-DM1	3/10	3/10	100	2.4	2.9
chMA79b-SMCC-DM1	1/10	0/10	50	1.2	2.9
huMA79b L2/H3-SMCC-DM1	2/10	0/10	100	2.9	2.4
huMA79b L2/H3-SMCC-DM1	0/10	0/10	50	1.4	2.4

2. Granta-519 이종이식편

표 10에 제시된 약물 접합체 및 투여량을 사용한 14일의 시간 과정에서, DM1에 접합된 MA79b-이식된 "인간화" 항체 변이체 17, 변이체 18, 변이체 28 및 변이체 32 (각각 huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 및 huMA79b.v32) (IgG로서 재설정된) 및 키메라 항-CD79b 항체 (chMA79b) (각각 huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1, huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1 및 chMA79b-SMCC-DM1)는 음성 대조군, HERCEPTIN® (트라스투주맙)-SMCC-DM1 (항-HER2-SMCC-DM1)에 비해 Granta-519 종양을 갖는 SCID 마우스에서 종양 성장의 억제력을 보였다. ADC는 모든 ADC 및 대조군에 대해 단일 용량 (표 10에 지시된 바와 같이)으로 제0일에 투여하였다. 구체적으로, huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1 및 huMA79b.v18-SMCC-DM1 항체 (IgG로서 재설정된)와 chMA79b-SMCC-DM1은 종양 성장을 유의하게 억제하였다 (도 21a).

추가로, huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1 및 chMA79b-SMCC-DM1과 대조군 HERCEPTIN® (트라스투주맙)-SMCC-DM1 (항-HER2-SMCC-DM1)를 사용하는 처리는 마우스의 체중 감소를 일으키지 않았다 (도 21b). 또한 추가로, 표 10에서, 시험된 10마리 마우스의 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)을 보이는 마우스의 수를 표시한다.

표 10

투여된 항체 (처리)	PR	CR	투여량 약물- DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물/ Ab)
대조군 항-HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	208	4	3.4
chMA79b-SMCC-DM1	0/10	0/10	107	2	3.6
chMA79b-SMCC-DM1	1/10	0/10	213	4	3.6
huMA79b.v17-SMCC-DM1	0/10	0/10	202	4	3.4
huMA79b.v18-SMCC-DM1	4/10	0/10	196	4	3.3
huMA79b.v28-SMCC-DM1	0/10	0/10	101	2	3.4
huMA79b.v28-SMCC-DM1	2/10	2/10	202	4	3.4
huMA79b.v32-SMCC-DM1	0/10	0/10	172	4	2.9

이종이식편에서 종양 진행을 유의하게 억제하는 MA79b-이식된 "인간화" 항체 ADC의 능력에 비추어, CD79b 분자는 포유동물에서 B-세포 연관 암, 예를 들어 림프종 (즉, 비-호지킨 림프종), 백혈병 (즉, 만성 림프구성 백혈병), 및 조혈 세포의 다른 암을 포함하는 종양의 치료를 위한 우수한 표적일 수 있다. 추가로, MA79b-이식된 "인간화" ADC는 B-세포 연관 암, 예를 들어 림프종 (즉, 비-호지킨 림프종), 백혈병 (즉, 만성 림프구성 백혈병), 및 조혈 세포의 다른 암을 포함한 종양의 생체내 종양 성장을 감소시키기 위해 유용하다.

실시예 4: CD79b 항체 동시-위치결정 (colocalization)

- [1227] MA79b-이식된 "인간화" 항체 및 항체 변이체가 세포 내로 내재화 시에 전달되는 장소를 결정하기 위해, B-세포주 내로 내재화된 항-CD79b 항체의 동시-위치결정 연구를 Ramos 세포주에서 평가할 수 있다. LAMP-1은 후기 엔도솜/라이소솜-유사 컴파트먼트인 MHC 클래스 II 컴파트먼트 (MIIC)를 포함한, 후기 엔도솜 및 라이소솜에 대한 마커이다 ([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)]). HLA-DM은 MIIC에 대한 마커이다.
- [1228] Ramos 세포를 3시간 동안 37°C에서, 라이소솜 분해를 억제하기 위해 10 μ g/ml 류펩틴 (로슈) 및 5 μ M 웨스타틴 (로슈)의 존재 하에 완전 카르보네이트-비함유 배지 (Gibco) 내에서 1 μ g/ml MA79b-이식된 "인간화" 항체 및 항체 변이체, FcR 블록 (block) (밀테니아이 (Miltenyi)) 및 25 μ g/ml Alexa647-트랜스페린 (몰레큘라 프로브스)과 함께 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 2회 세척하고, 3% 파라포름알데히드 (일렉트론 마이크로스코피 사이언시즈 (Electron Microscopy Sciences))로 20분 동안 실온에서 고정시키고, 50 mM NH₄Cl (시그마)로 켄칭시키고, 0.4% 사포닌/2% FBS/1% BSA로 20분 동안 투과시킨 후, 1 μ g/ml Cy3 항-마우스 (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson Immunoresearch))와 함께 20분 동안 인큐베이팅한다. 이어서, 반응을 20분 동안 마우스 IgG (몰레큘라 프로브스)로 차단시킨 후, Image-iT FX 신호 증강제 (몰레큘라 프로브스)와 함께 30분 인큐베이팅하였다. 마지막으로 세포를 Zenon Alexa488-표지된 마우스 항-LAMP1 (비디 파밍엔 (BD Pharmingen)) (라이소솜 및 MIIC (MHC 클래스 II 경로의 일부인 라이소솜-유사 컴파트먼트) 모두에 대한 마커)과 함께 20분 동안 인큐베이팅하고, 3% PFA로 후-고정시켰다. 세포를 20 μ l 사포닌 버퍼 내에 재현탁시키고 폴리-리신 (시그마) 코팅된 슬라이드에 부착시킨 후, DAPI-함유 VectaShield를 갖는 커버글래스 (벡터 래보라토리스 (Vector Laboratories))를 탑재한다. MIIC 또는 라이소솜의 면역형광을 위해, 세포를 상기와 같이 고정시키고 투과시키고 증강시킨 후, 제조자의 지시 (몰레큘라 프로브스)에 따라 파잉의 마우스 IgG의 존재 하에 Zenon 표지된 Alexa555-HLA-DM (비디 파밍엔) 및 Alexa488-Lamp1로 동시-염색하였다.
- [1229] 따라서, 면역형광에 의해 평가할 때 B-세포주의 MIIC 또는 라이소솜을 사용한 MA79b-이식된 "인간화" 항체 또는 항체 변이체의 동시-국재화는 포유동물에서 B-세포 연관 암, 예를 들어 림프종 (즉, 비-호지킨 림프종), 백혈병 (즉, 만성 림프구성 백혈병), 및 조혈 세포의 다른 암을 포함한 종양의 치료를 위한 우수한 물질로서 분자를 나타낼 수 있다.
- [1230] 실시예 5: 시스템인 조작된 항-CD79b 항체의 제조
- [1231] 시스템인 조작된 항-CD79b 항체의 제조를 본원에 개시된 바와 같이 수행하였다.
- [1232] MA79b 항체 (경쇄, 서열 4, 도 4; 및 중쇄, 서열 5, 도 5)를 코딩하는 DNA를 경쇄 및 중쇄를 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시켰다. MA79b 항체 (중쇄, 서열 5; 도 5)를 코딩하는 DNA를 또한 중쇄의 Fc 영역을 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시킬 수 있다.
- [1233] huMA79b.v17 항체 (중쇄, 서열 304, 도 15)를 코딩하는 DNA를 중쇄를 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시켰다. huMA79b.v17 항체 (경쇄, 서열 303; 도 15; 및 중쇄, 서열 304; 도 15)를 코딩하는 DNA를 또한 경쇄 또는 중쇄의 Fc 영역을 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시킬 수 있다.
- [1234] huMA79b.v18 항체 (중쇄, 서열 306, 도 16)를 코딩하는 DNA를 중쇄를 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시켰다. huMA79b.v18 항체 (경쇄, 서열 305; 도 16; 및 중쇄, 서열 306; 도 16)를 코딩하는 DNA를 또한 경쇄, 또는 중쇄의 Fc 영역을 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시킬 수 있다.
- [1235] huMA79b.v28 항체 (중쇄, 서열 308, 도 17)를 코딩하는 DNA를 중쇄를 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시켰다. huMA79b.v28 항체 (경쇄, 서열 307, 도 17; 및 중쇄, 서열 308, 도 17)를 코딩하는 DNA를 또한 경쇄, 또는 중쇄의 Fc 영역을 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시킬 수 있다.
- [1236] huMA79b.v32 항체 (경쇄, 서열 310, 도 18; 및 중쇄, 서열 309, 도 18)를 코딩하는 DNA를 경쇄 및 중쇄를 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시켰다.
- [1237] 항-cyno CD79b 항체 (경쇄, 서열 241; 도 45 및 중쇄, 서열 243, 도 47)를 코딩하는 DNA를 경쇄 및 중쇄를 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시켰다. 항-cyno CD79b 항체 (중쇄, 서열 243, 도 47)를 코딩하는 DNA를 또한 중쇄의 Fc 영역을 변형시키기 위해 본원에 개시된 방법에 의해 돌연변이시킬 수 있다.
- [1238] 시스템인 조작된 항-CD79b 항체의 제조에서, 경쇄를 코딩하는 DNA는 도 27 (MA79b thioMAb의 경쇄 서열 235) 및 도 49 (thioMAb 항-cyno CD79b (ch10D10)의 경쇄 서열 300)에 제시된 바와 같이 경쇄에서 카바트 위치 205에서

발린 (순차적 위치 209)을 시스테인으로 치환시키도록 돌연변이시켰다. 중쇄를 코딩하는 DNA는 도 48 (thioMAb 항-cyno CD79b (ch10D10) 항체의 중쇄 서열 244), 도 28 (MA79b thioMAb의 중쇄 서열 236), 도 24 (thioMAb huMA79b.v17의 중쇄 서열 228), 도 25 (thioMAb huMA79b.v18의 중쇄 서열 230) 및 도 26 (thioMAb huMA79b.v28의 중쇄 서열 232)에 제시된 바와 같이 중쇄에서 EU 위치 118에서 알라닌 (순차적 위치 118; 카바트 넘버 114)을 시스테인으로 치환시키도록 돌연변이시켰다. 항-CD79b 항체의 Fc 영역은 표 2-4에 제시된 바와 같이 중쇄 Fc 영역에서 EU 위치 400에서 세린 (순차적 위치 400; 카바트 넘버 396)을 시스테인으로 치환시키도록 돌연변이시켰다.

A. 환원 및 재산화에 의한 접합을 위한 시스테인 조작된 항-CD79b 항체의 제조

전장 시스테인 조작된 항-CD79b 모노클로날 항체 (ThioMAb)를 CHO 세포에서 발현시키고, 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 이어 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 정제된 항체를 500 mM 붕산나트륨 및 500 mM 염화나트륨 (약 pH 8.0) 내에 재구성하고, 약 50-100배 물과량의 1 mM TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염; [Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; 솔텍 벤처스]로 약 1-2 hr 동안 37°C에서 환원시켰다. 환원된 ThioMAb을 희석하고, HiTrap S 컬럼 상에 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 내에 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용출시켰다. 용출된 환원된 ThioMAb을 2 mM 테히드로아스코르브산 (dhAA)로 pH 7에서 3시간 동안, 또는 2 mM 수성 황산구리 (CuSO₄)로 실온에서 철야로 처리하였다. 주변 공기 산화가 또한 효과적인 수 있다. 버퍼를 세파텍스 G25 수지 상에서 용출에 의해 교환시키고, 1 mM DTPA를 함유하는 PBS로 용출시킨다. 티올/Ab 값은 용액의 280 nm에서 흡광도로부터 환원된 항체 농도, 및 DTNB (알드리치, 미국 위스콘신주 밀워키)와의 반응 및 412 nm에서 흡광도의 결정에 의한 티올 농도를 결정함으로써 추정한다.

실시예 6: 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 및 약물-링커 중간체의 접합에 의한 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 약물 접합체의 제조

실시예 5의 환원 및 재산화 절차 후에, 시스테인 조작된 항-CD79b 항체를 PBS (인산염 완충 염수) 버퍼 내에 재구성하고 얼음 상에서 냉각시켰다. 조작된 시스테인 항체에 대해 약 1.5 몰 당량의 아우리스타틴 약물 링커 중간체, 예를 들어 MC-MMAE (말레이미도카프로일-모노메틸 아우리스타틴 E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE, 또는 MC-val-cit-PAB-MMAF (티올-반응성 관능기, 예를 들어 말레이미도를 갖는)를 DMSO에 용해시키고, 아세트오닐 및 물에 희석하고, PBS 중의 냉각시킨 환원되고 재산화된 항체에 첨가하였다. 약 1시간 후에, 과잉의 말레이미드를 첨가하여 반응을 퀀칭시키고, 임의의 미반응된 항체 티올기를 캐핑한다. 반응 혼합물을 원심분리 초여과에 의해 농축하고, 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 약물 접합체를 정제하고, PBS 중의 G25 수지를 통한 용출에 의해 탈염시키고, 멸균 조건 하에 0.2 µm 필터를 통해 여과시키고, 저장을 위해 동결시킨다.

huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1의 제조는 다음과 같이 수행하였다. huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb 상의 유리 시스테인을 비스-말레이미도 시약 BM(PEO)₃ (피어스 케미칼 (Pierce Chemical))에 의해 변형시키고, 항체의 표면 상에 미반응된 말레이미도기를 남겼다. 이는 BM(PEO)₃을 50% 에탄올/물 혼합물에 10 mM의 농도로 용해시키고, 10배 물과량의 BM(PEO)₃를 인산염 완충 염수 중의 huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb을 함유하는 용액에 약 1.6 mg/ml (10 마이크로몰)의 농도로 첨가하고, 1시간 동안 반응시킴으로써 달성하였다. 과잉의 BM(PEO)₃은 150 mM NaCl 버퍼를 사용하는 30 mM 시트레이트 (pH 6) 중의 겔 여과 (HiTrap 컬럼, 파마시아 (Pharmacia))에 의해 제거하였다. 디메틸 아세타미드 (DMA)에 용해된 약 10배 물과량의 DM1을 huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO 중간체에 첨가하였다. 약물 모이어티 시약을 용해시키기 위해 디메틸포름아미드 (DMF)를 또한 사용할 수 있다. 반응 혼합물을 철야 반응시킨 후 PBS 내로 겔 여과 또는 투석하여 미반응된 약물을 제거하였다. PBS 중에서 S200 컬럼 상의 겔 여과를 이용하여 고분자량 응집물을 제거하고, huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1을 정제하였다.

샘플 프로토콜에 의해, thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 및 thio 대조군 항-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF를 생성하였다.

상기 절차에 의해, 다음의 시스테인 조작된 항-CD79b 항체 약물 접합체 (TDC)를 제조하고 시험하였다:

1. A118C thio huMA79b.v18-HC(A118C) 및 MC-MMAF의 접합에 의한 thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF;
2. A118C thio huMA79b.v18-HC(A118C) 및 BMPEO-DM1의 접합에 의한 thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1;
3. A118C thio huMA79b.v18-HC(A118C) 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 thio huMA79b.v18-HC(A118C)-

MCvcPAB-MMAE;

- [1249] 4. A118C thio huMA79b.v28-HC(A118C) 및 MC-MMAF의 접합에 의한 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF;
- [1250] 5. thio huMA79b.v28-HC(A118C) 및 BMPEO-DM1의 접합에 의한 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1;
- [1251] 6. thio huMA79b.v28-HC(A118C) 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-val-cit-PAB-MMAE;
- [1252] 7. A118C thio 항-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) 및 MC-MMAF의 접합에 의한 thio 항-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF;
- [1253] 8. A118C thio 항-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) 및 BMPEO-DM1의 접합에 의한 thio 항-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1;
- [1254] 9. A118C thio 항-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 thio 항-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE;
- [1255] 10. thio MA79b-HC(A118C) 및 MC-MMAF의 접합에 의한 thio MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF; 및
- [1256] 11. thio MA79b-LC(V205C) 및 MC-MMAF의 접합에 의한 thio MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF.

[1257] 실시예 7: 세포 표면 항원에 대한 시스테인 조작된 ThioMab 약물 접합체의 결합 친화도의 특성 결정

[1258] BJAB-루시페라제 세포 상에서 발현된 CD79b에 대한 thio huMA79b.v18, thio huMA79b.v28 약물 접합체 및 thio MA79b 약물 접합체의 결합 친화도를 FACS 분석에 의해 결정하였다. 추가로, cynoCD79b를 발현하는 BJAB 세포 상에서 발현된 CD79b에 대한 thio 항-cynoCD79b(ch10D10) 약물 접합체의 결합 친화도를 FACS 분석에 의해 결정하였다.

[1259] 간단히 설명하면, 100 μ l 중 약 1×10^6 세포를 변하는 양 ((항-cynoCD79b thioMab에 대해) cynoCD79b를 발현하는 BJAB-루시페라제 세포 또는 BJAB 세포의 백만개 세포당 1.0 μ g, 0.1 μ g 또는 0.01 μ g의 Ab)의 다음의 항-CD79b thioMab 약물 접합체 또는 네이키드 (대조군으로서 접합되지 않은 Ab) 중 하나와 접촉시켰다: (1) thio MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF 또는 (2) thio MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF (각각 도 29a-b); (3) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, (4) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-vcPAB-MMAE 또는 (5) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (각각 도 30b-d); (6) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (7) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 또는 (8) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (각각 도 31b-31d 참조); 또는 (9) thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (10) thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 또는 (11) thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF (각각 도 32b-32d 참조). PE 접합된 마우스 항-인간 Ig를 2차 검출 항체로서 사용하였다 (BD Cat#555787).

[1260] 세포 표면에 결합된 항-CD79b 항체는 PE 접합된 마우스 항-인간 Ig를 사용하여 검출하였다. 도 29-32의 플롯은 항원 결합이 시험된 모든 thioMab 약물 접합체에 대해 대략 동일하였음을 나타낸다.

[1261] 실시예 8: 항-CD79b ThioMab 약물 접합체에 의한 시험관내 세포 증식 감소에 대한 분석

[1262] 항-CD79b ThioMab-약물 접합체 (thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 및 thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 포함)의 시험관내 효력을 세포 증식 분석에 의해 측정하였다 (도 41a, BJAB-루시페라제; 도 41b, Granta-519; 도 41c, WSU-DLCL2). CellTiter-Glo® 발광 세포 생활력 분석이 상업적으로 이용가능하다 (프로메가 코퍼레이션, 콜레오프테라 (*Coleoptera*) 루시페라제의 재조합 발현에 기반한 균질 분석 방법 (US 5583024; US 5674713; US 5700670)). 상기 세포 증식 분석은 대사적 활성 세포의 지표인 존재하는 ATP의 정량을 기초로 하여 배양액 내의 생존가능한 세포의 수를 결정한다 ([Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160: 81-88 (1993)]; US 6602677). CellTiter-Glo® 분석은 자동화 고효율 스크리닝 (HTS)을 가능하게 하는 96-웰 포맷으로 수행하였다 (Cree et al., Anticancer Drugs, 6:398-404 (1995)). 균질 분석 절차는 단일 시약 (CellTiter-Glo® 시약)을 혈청-보충 배지 내에서 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 포함한다.

[1263] 균질 "첨가-혼합-측정" 포맷은 세포 용해, 및 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 신호의 생성을 일으킨다. 기질인 딱정벌레 (Beetle) 루시페린은 재조합 반딧불이 루시페라제에 의해 산화적으로 테카르복실화되면서, 동시에 ATP를 AMP로 전환시키고 광자를 생성한다. 생존가능한 세포는 상대 발광 단위 (RLU)에 반영된다. 데이터는

발광측정기 또는 CCD 카메라 영상화 장치에 의해 기록할 수 있다. 발광 출력은 시간에 따라 측정된 RLU로서 표현한다. %RLU는 "비-약물-접합체" 대조군에 비해 표준화된 RLU 백분율이다. 별법으로, 발광으로부터 광자를 섬광계의 존재 하에 섬광 계수기에서 계수할 수 있다. 따라서, 광 단위를 CPS (초당 계수)로서 표현할 수 있다.

[1264] thioMAb-약물 접합체의 효능은 CellTiter Glo 발광 세포 생활력 분석 (프로메가 코퍼레이션, Technical bulletin TB288; [Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)])으로부터 채택한 다음 프로토콜을 사용하는 세포 증식 분석에 의해 측정하였다:

[1265] 1. 배지 중 약 3000 BJAB, Granta-519 또는 WSU-DLCL2 세포를 함유하는 40 μ l의 세포 배양액의 분취액을 384-웰의 불투명 벽의 플레이트의 각각의 웰에 넣었다.

[1266] 2. TDC (ThioMAb 약물 접합체) (10 μ l)를 4중 실험의 실험 웰에 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13.7, 4.6 또는 1.5 ng/mL의 최종 농도로 첨가하고, 여기서 "비-약물 접합체" 대조군 웰에는 배지만을 넣고, 3일 동안 인큐베이팅하였다.

[1267] 3. 플레이트를 약 30분 동안 실온으로 평형화시켰다.

[1268] 4. CellTiter-Glo 시약 (50 μ l)을 첨가하였다.

[1269] 5. 내용물을 회전 진탕기 상에서 2분 동안 혼합하여, 세포 분해를 유도하였다.

[1270] 6. 플레이트를 실온에서 10분 동안 인큐베이팅하여 발광 신호를 안정화시켰다.

[1271] 7. 발광을 기록하고 그래프에 %RLU (상대 발광 단위)로서 보고한다. 약물 접합체-비함유 배지로 인큐베이팅한 세포로부터의 데이터를 0.51 ng/ml에서 플로팅하였다.

[1272] 배지: BJAB, Granta-519 및 WSU-DLCL2 세포는 RPMI1640/10%FBS/2mM 글루타민 내에서 성장시킨다.

[1273] 실시예 9: 항-CD79b ThioMAb 약물 접합체에 의한 생체내 종양 성장 억제에 대한 분석.

[1274] A. Granta-519 (인간 외투층 세포 림프종)

[1275] 유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이중이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이중이식편 (인간 외투층 세포 림프종)에서 thioMAb 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 11에 제시한다.

[1276] 대조군 Ab는 hu-항-HER2-MC-MMAF 또는 MA79b-MC-MMAF이었다. 대조군 HC(A118C) thioMAb는 thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MMAF thioMAb이었다. 결과를 표 11 및 도 33에 제시한다.

[1277] 도 33a는 표 11에 제시된 투여량으로 중재 A118C 또는 경쇄 V205C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이중이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF를 투여하면 음성 대조군 (항-hu-HER2-MC-MMAF 및 thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF)에 비해 종양 성장의 억제를 보였다. 다른 대조군은 MA79b-MC-MMAF를 포함하였다.

[1278] 추가로, 동일한 연구에서, 처음 14일 동안 체중 변화 비율 (%)을 각각의 용량군에서 결정하였다. 결과 (도 33b)는 이들 thioMAb 약물 접합체를 투여하면 상기 기간 동안 체중의 유의한 비율의 감소 또는 체중 손실을 일으키지 않았음을 나타낸다.

[1279] 또한 추가로, 표 11에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 11

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이종이식편에서 thio chMA79b-HC(A118C) 또는
thio chMA79b-LC(V205C) MMAF 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
대조군 hu- 항 -HER2-MC-MMAF	0/8	0/8	413	6.8	4.0
Thio 대조군 hu- 항 -HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	191	6.8	1.85
대조군 chMA79b-MC-MMAF	1/8	0/8	100	2.3	3.0
대조군 chMA79b-MC-MMAF	8/9	1/9	300	6.8	3.0
Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	63	2.3	1.9
Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	4/9	0/9	190	6.8	1.9
Thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	0/8	0/8	60	2.3	1.8
Thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	5/9	4/9	180	6.8	1.8

B. BJAB-루시퍼라제 (버킷 림프종) 이종이식편

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, 추가의 약물 접합체의 효능을 CB17 SCID 마우스에서 BJAB-루시퍼라제 이종이식편 (버킷 림프종)에서 시험하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 12에 제시한다.

대조군 항체는 huMA79b.v28 (SMCC-DM1에 접합된)이었다. 대조군 HC (A118C) thioMAb은 thio hu-항-HER2-HC(A118C) 항체 thioMAb (BMPEO-DM1, MC-MMAF 또는 MCvcPAB-MMAE에 접합된), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb 또는 thio hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C) thioMAb (MC-MMAF에 접합된)이었다. 결과를 아래 표 12 및 도 34에 제시한다.

도 34a는 표 12에 제시된 바와 같은 huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb 약물 접합체로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 BJAB-루시퍼라제 이종이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMAb 약물 접합체를 투여하면 음성 대조군 항체 약물 접합체 (thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE)에 비해 종양 성장의 억제력을 보였다. 다른 대조군은 thio-huMA79b.v28-HC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 및 thio-hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF이었다.

추가로, 동일한 연구에서, 처음 7일 동안 체중 변화 비율 (%)을 각각의 용량군에서 결정하였다. 결과 (도 34b)는 이들 thioMAb 약물 접합체를 투여하면 상기 기간 동안 체중의 유의한 비율의 감소 또는 체중 손실을 일으키지 않았음을 나타낸다.

또한 추가로, 표 12에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 12

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 BJAB-루시페라제 이종이식편에서 Thio HuMA79b.v28-HC(A118C)
MMAE, MMAF, 및 DM1 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF, MMAE 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	58	2	1.9
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	46	2	1.55
대조군 huMA79b.v28-SMCC-DM1	2/10	3/10	101	2	3.4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	2/10	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	10/10	57	2	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	10/10	54	2	1.87
Thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio 대조군 hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	4/10	59	2	1.96

C. WSU-DLCL2 (미만성 대세포 림프종) 이종이식편

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 여포성 림프종 WSU-DLCL2 이종이식편 (미만성 대세포 림프종)에서 thioMAb 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량은 아래 표 13에 제시한다.

대조군 항체는 huMA79b.v28 (SMCC-DM1에 접합된)이었다. 대조군 HC(A118C) thioMAb은 thio hu-항-HER2-HC(A118C) 항체 thioMAb (BMPEO-DM1, MC-MMAF 또는 MCvcPAB-MMAE에 접합된), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb 또는 thio 항-CD22 10F4v3-HC(A118C) thioMAb (MC-MMAF에 접합된)이었다. 결과를 아래 표 13에 제시한다.

도 35a는 표 13에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 WSU-DLCL2 (미만성 대세포 림프종) 이종이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE를 투여하면 음성 대조군 (thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-huMA79b.v28-HC(A118C))에 비해 종양 성장의 억제를 보였다. 다른 대조군은 thio-huMA79b.v28-HC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 및 thio hu-항-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF를 포함하였다.

thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC는 상기 연구에서 시험체 중 가장 효과적인 것으로 보였다.

추가로, 동일한 연구에서, 처음 7일 동안 체중 변화 비율 (%)을 각각의 용량군에서 결정하였다. 결과 (도 35b)는 이들 thioMAb 약물 접합체를 투여하면 상기 기간 동안 체중의 유의한 비율의 감소 또는 체중 손실을 일으키지 않았음을 나타낸다.

또한 추가로, 표 13에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비)

표 13

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 WSU-DLCL2 이종이식편에서 Thio HuMA79b.v28-HC(A118C)
MMAE, MMAF, 및 DM1 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF, MMAE 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	115	4	1.9
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	92	4	1.55
대조군 huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/10	0/10	202	4	3.4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/10	1/10	115	4	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	3/10	108	4	1.87
Thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA
Thio 대조군 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	118	4	1.96
Thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA

[1295]

[1296]

D. DOHH2 (여포성 림프종) 이종이식편

[1297]

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 DOHH2 이종이식편 모델에서 B-세포 종양 부피를 감소시키는 thioMab 약물 접합체의 능력을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제 0일에 투여됨)은 아래 표 14에 제시한다.

[1298]

대조군 Ab는 huMA79b.v28 (SMCC-DM1에 접합된)이었다. 대조군 HC(A118C) thioMab는 thio hu-항-HER2-HC(A118C) thioMab (BMPEO-DM1, MC-MMAF 또는 MCvcPAB-MMAE에 접합된), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMab 및 thio hu-항-CD22-HC(A118C) (MC-MMAF에 접합된)이었다. 결과를 표 14 및 도 36에 제시한다.

[1299]

도 36A는 표 14에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 DOHH2 세포 이종이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMab 약물 접합체를 표 14에 제시된 투여량에서 투여하면 음성 대조군 약물 접합체 (thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE)에 비해 종양 성장의 억제를 보였다. 다른 대조군은 thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C), thio 대조군 항-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C) 및 대조군 huMA79b.v28-SMCC-DM1을 포함하였다.

[1300]

또한 추가로, 표 14에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm^3 로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 14

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 DOHH2 이종이식편에서 Thio HuMA79b.v28-HC(A118C)
DM1, MMAF 및 MMAE 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1.9
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1.55
대조군 huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/8	1/8	202	4	3.4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/9	1/9	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	4/9	115	4	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	9/9	108	4	1.87
Thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C)	1/9	0/9	NA	4	NA
Thio 대조군 항-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	118	4	1.96

E. BJAB-루시퍼라제 (버킷 림프종) 이종이식편

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 BJAB-루시퍼라제 (버킷 림프종) 이종이식편에서 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 15에 제시한다.

대조군 항체는 비히클 (버퍼 (ADC에 대해) 단독)이었다. 대조군 HC (A118C) thioMAb은 thio hu-항-HER2-HC(A118C) 항체 thioMAb (BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE 또는 MC-MMAF에 접합된), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb 또는 thio 항-CD22 10F4v3-HC(A118C) thioMAb (MC-MMAF에 접합된)이었다. 결과를 아래 표 15에 제시한다.

도 37A는 표 15에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 BJAB-루시퍼라제 이종이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF를 투여하면 음성 대조군 (thio-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF)에 비교할 때 종양 성장의 억제를 보였다. 다른 대조군은 thio huMA79b.v28-HC(A118C) 및 thio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF를 포함하였다.

또한 추가로, 표 15에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 15

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 BJAB-루시퍼라제 이종이식편에서 Thio huMA79b.v28-HC
(A118C) MMAE, MMAF, 및 DM1 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF, MMAE 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
대조군 비히클	0/10	0/10	NA	NA	NA
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	57	2	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	23	1	1.55
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	29	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	2/10	0/10	27	1	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/10	0/10	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	1/10	27	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/8	1/8	28	1	1.9
Thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	1	NA
Thio 대조군 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	1/10	30	1	1.96

[1307]

[1308]

F. Granta-519 (인간 외투층 세포 림프종) 이종이식편

[1309]

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이종이식편 (인간 외투층 세포 림프종)에서 thioMAb 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 16에 제시한다.

[1310]

대조군 HC (A118C) thioMAb은 thio hu-항-HER2-HC(A118C) thioMAb (BMPEO-DM1 또는 MC-MMAF에 접합된)이었다. 결과를 표 16 및 도 38에 제시한다.

[1311]

도 38a는 표 16에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이종이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC-(A118C)-BMPEO-DM1 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF thioMAb를 표 16에 제시된 투여량으로 투여하면 대조군 약물 접합체에 비교할 때 종양 성장의 억제력을 보였다.

[1312]

추가로, 동일한 연구에서, 처음 14일 동안 체중 변화 비율 (%)을 각각의 용량군에서 결정하였다. 결과 (도 38b)는 이들 thioMAb 약물 접합체를 투여하면 상기 기간 동안 체중의 유의한 비율의 감소 또는 체중 손실을 일으키지 않았음을 나타낸다.

[1313]

표 16에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)을 보이는 마우스의 수를 표시한다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 16

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이종이식편에서 Thio HuMA79b.v28-HC(A118C)
DM1 및 MMAF 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	342	12	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	346	12	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/6	0/6	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/8	4/8	219	8	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	5/8	329	12	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	1/8	1/8	57	2	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	2/8	1/8	115	4	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	6/8	2/8	229	8	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	4/8	4/8	344	12	1.95

G. WSU-DLCL2 (미만성 대세포 림프종) 이종이식편

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 WSU-DLCL2 이종이식편 (미만성 대세포 림프종)에서 thioMab 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 17에 제시한다.

대조군 항체는 비히클 (버퍼 (ADC에 대해) 단독)이었다. 대조군 thio Mab는 thio hu-항-HER2-HC(A118C) 항체 thioMab (BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE 또는 MC-MMAF에 접합된)이었다. 결과를 표 17 및 도 39에 제시한다.

도 39는 표 17에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 WSU-DLCL2 이종이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (0.5, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg 및 4.0 mg/kg의 Ab 투여량)를 투여하면 음성 대조군 (thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF 및 A-비히클)에 비교할 때 종양 성장의 억제를 보였다.

또한 추가로, 표 17에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 17

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 WSU-DLCL2 이종이식편에서 Thio HuMA79b.v28-HC(A118C)
MMAE, MMAF, 및 DM1 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF, MMAE 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
대조군 비히클	0/9	0/9	NA	NA	NA
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1.55
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	2/9	112	4	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/9	0/9	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	0/9	14	0.5	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	27	1.0	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	1/9	55	2.0	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	7/9	110	4.0	1.9

H. Granta-519 (인간 외투층 세포 림프종) 이종이식편

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이종이식편 (인간 외투층 세포 림프종)에서 thioMAb 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 18에 제시한다.

대조군 thio MAb은 thio hu-항-HER2-HC(A118C) (BMPEO-DM1에 접합된) 및 thio hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 항체 thioMAb이었다. 결과를 아래 표 18에 제시한다.

도 40A는 표 18에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이종이식편에서 시간에 따른 평균 종양 부피의 변화를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg 및 4.0 mg/kg의 Ab 투여량)를 투여하면 음성 대조군 (thio-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1 및 thio-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE)에 비교할 때 종양 성장의 억제를 보였다.

또한 추가로, 표 18에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm³로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 18

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 Granta-519 이종이식편에서 Thio HuMA79b.v28-HC(A118C)
DM1 및 MMAE 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF, MMAE 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/10	1/10	92	4	1.55
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	0/10	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	1/10	13	0.5	1.87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	0/10	27	1.0	1.87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	7/10	54	2.0	1.87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	10/10	108	4.0	1.87

I. BJAB-cynoCD79b 이종이식편

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 cynoCD79b를 발현하는 BJAB (버피크 림프종) 세포 (BJAB-cynoCD79b) 이종이식편에서 thioMab 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 18에 제시한다.

대조군 Ab는 비히클 (버피 단독)이었다. 대조군 thio MAb는 thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF 및 thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 항체 thioMab이었다. 결과를 표 19 및 도 50에 제시한다.

도 50은 표 19에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 BJAB-cynoCD79b 이종이식편에서 시간에 따른 종양 성장의 억제를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 및 thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF 뿐만 아니라 thio-항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 및 thio-항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF를 투여하면 음성 대조군 (thio-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 및 thio-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF 및 A-비히클)에 비교할 때 종양 성장의 억제를 보였다.

또한 추가로, 표 19에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm^3 로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 19

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 BJAB-cynoCD79b 이종이식편에서 Thio
항-cyno CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1, MMAF 또는 MMAE 또는
Thio HuMA79b.v28 DM1, MMAF 또는 MMAE 접합체 투여

Antibody administered	PR	CR	투여량 MMAF, MMAE 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
대조군 비히클	0/9	0/9	NA	NA	NA
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	57	2	1.86
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	23	1	1.55
Thio 대조군 hu-항-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	29	1	1.9
Thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	1/8	53	2	1.8
Thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	2/9	27	1	1.86
Thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	1/9	28	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/9	0/9	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	2/9	27	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	7/9	1/9	28	1	1.9

J. BJAB-cynoCD79b 이종이식편

유사한 연구에서, 실시예 3에 논의된 것 (상기 참조)과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하고, 투여되는 약물 접합체 및 투여량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 cynoCD79b를 발현하는 BJAB (버피크 림프종) 세포 (BJAB cynoCD79b) 이종이식편에서 thioMab 약물 접합체의 효능을 연구하였다. 약물 접합체 및 투여량 (모든 ADC 및 대조군에 대해 제0일에 투여됨)은 아래 표 19에 제시한다.

대조군 thio MAb은 thio-hu-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C), 및 thio-항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) 항체 thioMab이었다. 결과를 표 20 및 도 51에 제시한다.

도 51은 표 20에 제시된 투여량으로 중쇄 A118C 항-CD79b TDC로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 BJAB-cynoCD79b 이종이식편에서 시간에 따른 종양 성장의 억제를 플로팅한 그래프이다. 구체적으로, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1뿐만 아니라 thio-항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1을 투여하면 음성 대조군 (thio-항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1)에 비교할 때 종양 성장의 억제를 보였다. 다른 대조군은 thio-huMA79b.v28-HC(A118C) 및 thio-항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)를 포함하였다.

결과를 아래 표 20에 제시한다. 표 20에서, 시험된 총수 중 PR = 부분 퇴행 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 제0일에 측정된 종양 부피의 50% 미만으로 떨어진 경우) 또는 CR = 완전 관해 (투여 후 임의의 시점에서 종양 부피가 0 mm^3 로 떨어진 경우)를 보이는 마우스의 수를 표시하고, NA = 적용불가이다. (DAR = 약물 대 항체 비).

표 20

생체내 종양 부피 감소,
CB17 SCID 마우스에서 BJAB-cynoCD79b 이중이식편에서
Thio 항-cyno CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1 또는
Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1 접합체 투여

투여된 항체	PR	CR	투여량 MMAF, MMAE 또는 DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	투여량 Ab (mg/kg)	약물비 (약물 /Ab)
Thio 대조군 hu- 항-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1.86
Thio 대조군 huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio 대조군 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/10	0/10	27	1	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	2/10	55	2	1.85
Thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	27	1	1.8
Thio 항-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	53	2	1.8

[1338]

[1339]

상기 명세서는 당업자가 본 발명을 실시하기 위해 충분한 것으로 생각된다. 기탁된 실시태양은 본 발명의 특정 측면의 단일 예시로서 의도되고, 기능상 동등한 임의의 구성체가 본 발명의 범위 내에 있으므로, 본 발명은 기탁된 구성체에 의해 범위가 제한되지 않아야 한다. 본원에서 물질의 기탁은 본원에 포함된 기록된 명세서가 그의 최선의 방식을 포함하는 본 발명의 임의의 측면의 실시를 가능하게 하기에 부적당하다고 인정하는 것이 아니고, 또한 그가 나타내는 특정 예시로 특허청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 실제로, 본원에 제시되고 기재된 것에 추가로, 본 발명의 다양한 변형이 상기 명세서로부터 당업자에게 명백해질 것이고, 이는 특허청구범위의 범위 내에 속한다.

도면

도면1

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCTCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCAATGGCCAGGCTGGCGTTGCTCTCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTTATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCCGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAGGGCCGATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTGACGAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCTGTCCTATCTTCTCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGAAGTCTCG
GAGCTGCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCTTGGACCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCCACAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCACACATGGGATGGGGAGGCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCCGAATGGACTCGGAGCCGAGGGCTCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACCTGGGCCCCAGAAAGGCCACAGGAACATATTCTCTCTCCGCAACCAC
TCCACCCCCAGGGAGGCCCTGGCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

도면2

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNNTSEVYQGGCTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

신호 서열.

아미노산 1-28.

막횡단 도메인.

아미노산 5-25, 159-179.

면역글로불린 도메인.

아미노산 58-124.

면역수용체 티로신계 활성화 모티프.

아미노산 193-213.

N-글리코실화 부위.

아미노산 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.

단백질 키나제 C 인산화 부위.

아미노산 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.

카제인 키나제 II 인산화 부위.

아미노산 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.

티로신 키나제 인산화 부위.

아미노산 113-120.

N-미리스토일화 부위.

아미노산 40-45, 118-123.

도면3

키메라 항-인간 CD79b (chMA79b) 경쇄

CACTCCCAGCTCCAACCTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATTGGGATGGTCATGT
ATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTGAGATATCGTGCTGACCCAATC
TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAA
GTGTTGATTATGATGGTGATAGTTTTTGAAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC
AAACTCTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAG
TGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGCTCACGTTCCGGGGCAGGCACCGAGCTGGAACCTC
AAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGTAAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGT
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTTCAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAG
TTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGAATTAATTCGGC

도면4

키메라 항-인간 CD79b (chMA79b) 경쇄

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSTFLNWYQKPGQPPKLFYAAASNLES
GIPARFSGSGSDFTFLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRITVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEODSKDSTYSLS
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

도면5

키메라 항-인간 CD79b (chMA79b) 중쇄

TCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAA
CTGCAACTGGAGTACATTCAGAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGATGAAGCCT
GGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAGTTACTGGATAGA
GTGGGTAAAGCAGAGGCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAGGTG
GTGATACTAACTACAATGAGATTTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCC
AACACAGCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTAC
AAGACGAGTACCGGTTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAATGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGA
CAAAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGA
CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT

도면6

키메라 항-인간 CD79b (chMA79b) 중쇄

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGDDTNY
NEIFK GKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLY
SLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHODWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTK
NOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOQ
NVFSCSVMHREALHNHYTOKSLSLSPG

VL 서열

카바트 # 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

카바트-CDRL1
코타아-CDRL1

접속-CDRL1

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 I A W Y Q
MA79b D I V L T T Q S P E L S L K V I S L G Q R E T I E C K A S Q S V D Y D G D S F L N W Y Q
huMA79b 이식편 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V D Y D G D S F L N W Y Q
huMA79b.v17 D I Q L T T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V D Y D G D S F L N W Y Q
huMA79b.v18 D I Q L T T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V D Y D G D S F L N W Y Q
huMA79b.v28 D I Q L T T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V D Y D G D S F L N W Y Q
huMA79b.v32 D I Q L T T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V D Y D G D S F L N W Y Q
*

AI 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 *

카바트 # 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

카바트-CDRL2
코타아-CDRL2

접속-CDRL2

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
MA79b Q K P G Q E P K L L I Y A A S S L E S G L I P A R F S G S G S G T D F T L N I E P V E E
huMA79b 이식편 Q K P G K A P K L L I Y A A S S N 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
huMA79b.v17 Q K P G K A P K L L I Y A A S S N 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
huMA79b.v18 Q K P G K A P K L L I Y A A S S N 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
huMA79b.v28 Q K P G K A P K L L I Y A A S S N 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
huMA79b.v32 Q K P G K A P K L L I Y A A S S N 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
*

BI 2 3 4 5 6 7

VII 서론

카바트# 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

카바트 - CDR L3

코티아-CDRL3

附註 - CDR L3

huki

MA 79b

huMA79b 이식편

hulwA/9b.v1/ E

hulwA/9b.V18 E
hulwA70b.V28 F

h1M479b v32 F

[illegible]

CL 2 3 4 5 6 7

86

도면7b

서열 9
서열 10
서열 11
서열 169
서열 188
서열 207
서열 226

V서열

카타트#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41

카바트 - CDR H1

五	

접합-CDRH1

27 5 11 9

[illegible]

01 2 3 4 5 6 7 8 9 10

42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 52a 52b 52c 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

카바트 - CDR H2

코티아 -

humH	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L		
MA79b	G	H	G	L	E	W	V	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	L	Y	L	
humMA79b 아식련	G	K	G	L	E	W	V	I	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	L	Y	L
humMA79b.v17	G	K	G	L	E	W	V	I	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	A	T	F	S	A	D	T	S	K	N	T	L	Y	L
humMA79b.v18	G	K	G	L	E	W	V	I	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	A	T	F	S	A	D	T	S	K	N	T	L	Y	L
humMA79b.v28	G	K	G	L	E	W	V	I	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	A	T	F	S	A	D	T	S	K	N	T	L	Y	L
humMA79b.v32	G	K	G	L	E	W	V	I	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	A	T	F	S	A	D	T	S	K	N	T	L	Y	L
	*						*																			*												*			

EX 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

서열

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

카바트 - CDR H3

제목 - CDR H3

huM11	MA79b	huMA79b v17	huMA79b v18	huMA79b v28	huMA79b v32
Q	Q	Q	Q	Q	Q
M	L	M	M	M	M
N	S	N	N	N	N
S	S	S	S	S	S
L	L	L	L	L	L
R	T	R	R	R	R
A	S	A	A	A	A
E	E	E	E	E	E
D	D	D	D	D	D
T	S	T	T	T	T
A	A	A	A	A	A
V	V	V	V	V	V
Y	Y	Y	Y	Y	Y
C	C	C	C	C	C
A	T	A	T	A	T
R	R	R	R	R	R
G	G	G	G	G	G
V	V	V	V	V	V
P	P	P	P	P	P
V	V	V	V	V	V
Y	Y	Y	Y	Y	Y
C	C	C	C	C	C
T	T	T	T	T	T
R	R	R	R	R	R
R	R	R	R	R	R
V	V	V	V	V	V
P	P	P	P	P	P
I	I	I	I	I	I
R	R	R	R	R	R
T	T	T	T	T	T
R	R	R	R	R	R
V	V	V	V	V	V
P	P	P	P	P	P
I	I	I	I	I	I
R	R	R	R	R	R
F	F	F	F	F	F
D	D	D	D	D	D
Y	Y	Y	Y	Y	Y
M	M	M	M	M	M
G	G	G	G	G	G
F	F	F	F	F	F
D	D	D	D	D	D
Y	Y	Y	Y	Y	Y
M	M	M	M	M	M
G	G	G	G	G	G
F	F	F	F	F	F
D	D	D	D	D	D
Y	Y	Y	Y	Y	Y
M	M	M	M	M	M
G	G	G	G	G	G

카바트 105 106 107 108 109 110 111 112 113

humM1	humM79b	humM79b	humM79b.v17	humM79b.v18	humM79b.v28	humM79b.v22
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
G	G	G	G	G	G	G
T	T	T	T	T	T	T
A	A	A	A	A	A	A
C	C	C	C	C	C	C
V	V	V	V	V	V	V
S	S	S	S	S	S	S
서열 13	서열 14	서열 15	서열 170	서열 189	서열 208	서열 227

도면 8b

도면9

A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

L1 K A S Q S V D Y D G D S F L N 서열 131

K A S K S V D Y D G D S F L N 서열 17; SPL-2

L2

	B	1	2	3	4	5	6	7	
		A	A	S	N	L	E	S	서열 132
	A	A	S	N	R		E	S	서열 18
	A	A	S	N	L	K		S	서열 19

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9
 L3 **Q Q S N E D P L T** 서열 133
 Q Q S N **S** D P L T 서열 20; SPL-5
 Q Q S N **K** D P L T 서열 21

도면10

[illegible]

도면11

MA79b 변이체 IgG	비아코아 KD (nM)		고정된 항원
	Fab	IgG	
MA79b	200	2	hu CD79b.ecd-Fc
		4.7	hu CD79b.ecd
hu MA79b 이식편		261	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2-2	44		hu CD79b.ecd-Fc
	39	43	hu CD79b.ecd
hu MA79b H3-10		29	hu CD79b.ecd
hu MA79b H1-6		42	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2/H3		2	hu CD79b.ecd-Fc
		3	hu CD79b.ecd
		1	16mer 펩티드

도면12

존재하는 뮤린 프레임워크 잔기												VL 내에서 안정성에 대한 변화				이거 결합 배수		
huMA79 FW 변이체 IgG		VL	VH										28 29 94 95				CDR-H3 seq	Kd 변이체 / Kd 키메라
huMA79 이식편 모든 프레임워크		4 47	48	67	69	71	73	75	78	80								
1			48			71	73		78						wt	56		
2		47				71	73		78						wt	1		
3				67	69	71	73	75	78	80					wt	9.4		
4					69	71	73	75	78	80					wt	18		
5			48	67	69	71	73	75	78	80					wt	5.5		
6			48	67		71	73		78						wt	12		
7			48		69	71	73		78						wt	3.5		
8			48	67	69	71	73		78						wt	1.7		
9			48	67	69	71	73		78	80					wt	1.8		
10			48	67	69	71	73	75	78						wt	NA		
11			48	67	69	71	73	75	78	80				H3-10	0.6			
12			48	67	69	71	73		78					H3-10	0.5			
13		47	48		69	71	73		78					wt	1.8			
14	4		48		69	71	73		78					wt	1.1			
15	4	47	48		69	71	73		78					wt	0.8			
16	4		48	67		71	73		78					wt	1.6			
17	4		48	67	69	71	73		78					wt	1.0			
18	4		48	67	69	71	73		78					H3-10	0.4			
19	4		48	67	69	71	73		78			S	E	H3-10	NDB			
20	4		48	67	69	71	73		78			S	E	H3-10	NDB			
21	4		48	67	69	71	73		78			S	E	H3-10	NDB			
22	4		48	67	69	71	73		78			E	N	H3-10	NDB			
23	4	47	48	67	69	71	73		78			S	E	H3-10	25			
24	4	47	48	67	69	71	73		78			S	E	H3-10	NDB			
25	4	47	48	67	69	71	73		78			S	E	H3-10	NDB			
26	4	47	48	67	69	71	73		78			E	N	H3-10	NDB			
27	4	47	48	67	69	71	73		78					H3-10				
28	4		48	67	69	71	73		78			E		H3-10	0.8			
29			48	67	69	71	73		78				N	H3-10	매우 약함			
30	4	47	48	67	69	71	73		78				A	H3-10	1.3			
31	4	47	48	67	69	71	73		78				S	H3-10	1.0			
32	4	47	48	67	69	71	73		78					H3-10	1.6			
33	4	47	48	67	69	71	73		78				A	H3-10	매우 약함			
34	4	47	48	67	69	71	73		78				E	H3-10	NDB			

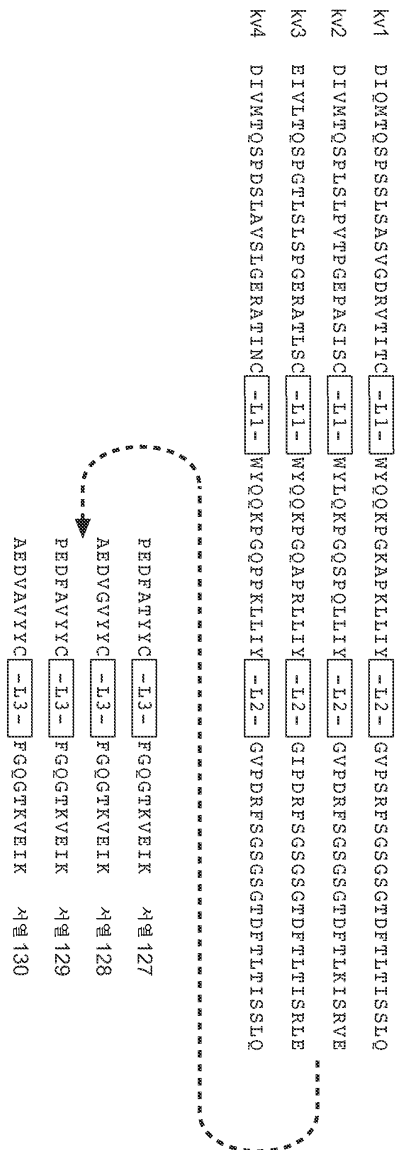
도면13a

I			
A	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYSFTT	-H1-	WVRQAPGGGLEWVG
B	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWV
C	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWV
D	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWV
II			
A	QVQLQESGPGLVKPQSQTLSITCTVSGGSYS	-H1-	WIRQPPGKGLEWVG
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWV
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWV
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWV
III			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
IV			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
V			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV

도면13b

I			
A	RVTITADTSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	RVTITADTSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	RVTITADTSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	RVTITADTSTSTAYMELSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS
II			
A	RVTISVDTSKNQFSKLSSVTADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	RVTISVDTSKNQFSKLSSVTADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	RVTISVDTSKNQFSKLSSVTADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	RVTISVDTSKNQFSKLSSVTADTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS
III			
A	RFTISRDNKNTLYLOMNSLRADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	RFTISRDNKNTLYLOMNSLRADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	RFTISRDNKNTLYLOMNSLRADTAVYYCA	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	RFTISRDNKNTLYLOMNSLRADTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS
IV			
A	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYCSR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYCSR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYCS	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS
V			
A	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYCA	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRADTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS

도면14



도면15

A. huMA79b.v17 경쇄

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 152)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (서열 153)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 154)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (서열 155)
 HVR1-LC: KASQSVVDYDGD SFLN (서열 156)
 HVR2-LC: AASNLES (서열 157)
 HVR3-LC: QQSNE DPLT (서열 158)
 CL1: TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 159)

경쇄 :

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVVDYDGD SFLN WYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSNE DPLTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (서열 303)

LC-가변 도메인:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVVDYDGD SFLN WYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSNE DPLTFGQGTKVEIKR (서열 169)

B. huMA79b.v17 중쇄

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 160)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (서열 161)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 162)
 FR4-HC: WGQGLTVTVSS (서열 163)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (서열 164)
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 165)
 HVR3-HC: TRRVVFYFDY (서열 166)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHT
 (서열 167)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 168)

중쇄 :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 304)

HC-가변 도메인:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLTVTVSS (서열 170)

도면16

A. huMA79b.v18 경쇄

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTTTC (서열 171)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (서열 172)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 173)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (서열 174)
 HVR1-LC: KASQSVDDYDGSFLN (서열 175)
 HVR2-LC: AASNLES (서열 176)
 HVR3-LC: QQSNEDPLT (서열 177)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 178)

경쇄 :

DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSVDDYDGSFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESQVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (서열 305)

LC-가변 도메인:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSVDDYDGSFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESQVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (서열 188)

B. huMA79b.v18 중쇄

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 179)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (서열 180)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 181)
 FR4-HC: WGQGLVTVSS (서열 182)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (서열 183)
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 184)
 HVR3-HC: TRRVPIRLDY (서열 185)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (서열 186)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 187)

중쇄 :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 306)

HC-가변 도메인:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSS (서열 189)

도면17

A. huMA79b.v28 경쇄

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTTTC (서열 190)
 FR2-LC: WYQOKPGKAPKLLIY (서열 191)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 192)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (서열 193)
 HVR1-LC: KASQSVDEYEGDSFLN (서열 194)
 HVR2-LC: AASNLES (서열 195)
 HVR3-LC: QQSNEPLT (서열 196)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGGLSSPVTKSFNRGEC
 (서열 197)

경쇄:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSVDEYEGDSFLNWWYQOKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSG
 SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 GLSSPVTKSFNRGEC (서열 307)

B. huMA79b.v28 중쇄

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 198)
 FR2-HC: WVRQAPGKLEWI (서열 199)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 200)
 FR4-HC: WGQGTTLVTVSS (서열 201)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (서열 202)
 HVR2-HC: GEILPGGDTNRYNEIFKG (서열 203)
 HVR3-HC: TRRVPIRLDY (서열 204)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (서열 205)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 206)

중쇄:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKLEWIGEILPGGDTNRYNEIFKGRA
 TFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 308)

도면18

A. huMA79b.v32 경쇄

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 209)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLFYIY (서열 210)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 211)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (서열 212)
 HVR1-LC: KASQSVSDYSGDSFLN (서열 213)
 HVR2-LC: AASNLES (서열 214)
 HVR3-LC: QQSNEDPLT (서열 215)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 216)

경쇄 :

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYSGDSFLNWWYQQKPGKAPKLFYIYAASNLESQVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (서열 309)

LC-가변 도메인:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYSGDSFLNWWYQQKPGKAPKLFYIYAASNLESQVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (서열 226)

B. huMA79b.v32 중쇄

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 217)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (서열 218)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 219)
 FR4-HC: WGQGTILVTVSS (서열 220)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (서열 221)
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (서열 222)
 HVR3-HC: TRRVPIRLDY (서열 223)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (서열 224)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG (서열 225)

중쇄:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG (서열 310)

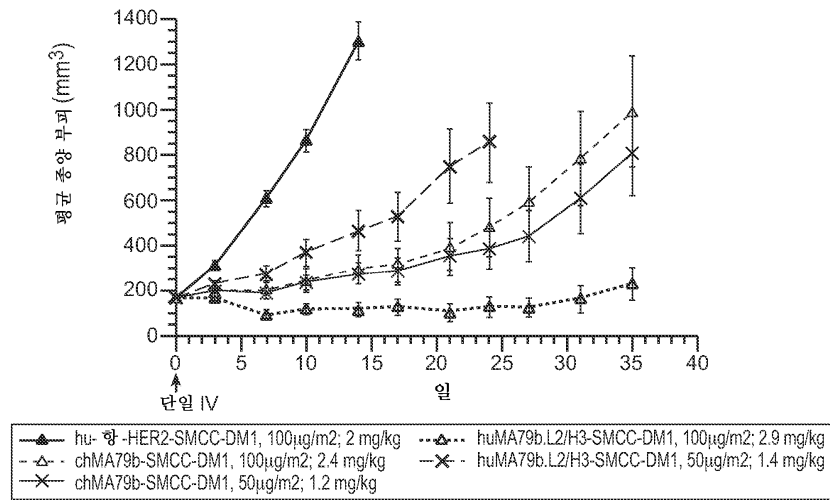
HC-가변 도메인:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTILVTVSS (서열 227)

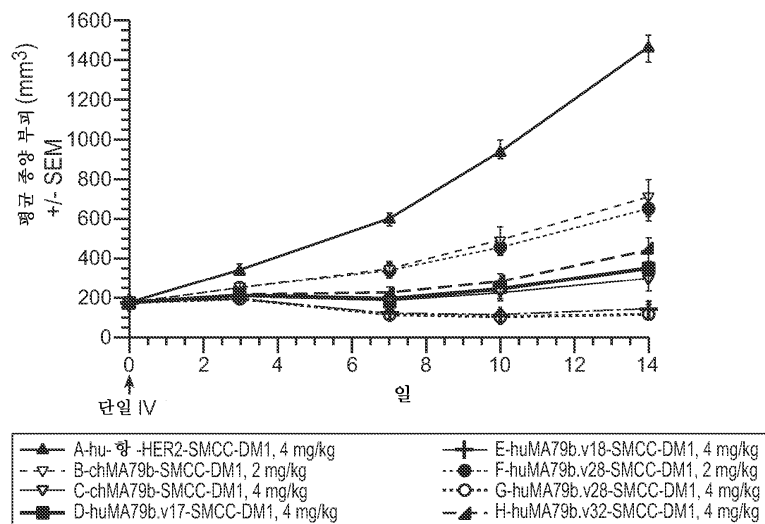
		신호 계열		시열 패턴드									
hCD79b	1	MARIALSPVPSHWMVA	LLLLLSAEP	VPAARSEDRI	RNP	PKG	SACSR	IWQS	49				
CynCD79b	1	MARIALSPVSSH	WLVALLLSAAEP	VPAAKSEDL	YP	NPKG	SACSR	IWQS	50				
mCD79b	1	MATLVLSMPCH	WILFL	LLLFSGEP	VPAMTSS	DLPLNF	QGS	SPCSQ	IWQH	49			
hCD79b	50	PRFIARKRGFTV	KMHCMN	NSASGN	VSWLWKQ	EMDEN	PQOL	KLEK	GRMEE	98			
CynCD79b	51	PRFIARKRGFTV	KMHCVT	NSTFSI	VSWLRK	RETDKE	PQVNL	EQGH	MHO	100			
mCD79b	50	PRFAAKKR	SSMKFHC	YTN--HSG	ALTWFR	KRGSQ	QPELV	SEGR	IVQ	96			
hCD79b	99	SQNE	SLATLI	QGIREF	DN	GIYFC	QOKCN	NTSE	VYQ	GGTELR	VMGFST	147	
CynCD79b	101	TQNS	SVTL	IQDIR	FED	NGIYFC	QOKCS	KTSE	VYR	GGTELR	VMGFST	149	
mCD79b	97	TQNG	SVTL	IQNIQ	YED	NGIYFC	KOKCDS	ANHNV	TDSC	GTELR	VMGFST	146	
TM 패턴													
hCD79b	148	LAQLKQ	RNTLK	DGIIM	IQTL	ILFI	IVPI	FL	LLDK	DSKAG	MEEDH	TYE	197
CynCD79b	150	LAQLKQ	RNTLK	DGIIM	IQTL	ILFI	IVPI	FL	LLDK	DSKAG	MEADH	TYE	199
mCD79b	147	LDQLK	RNTLK	DGIIL	IQTL	ILFI	IVPI	FL	LLDK	DDGKAG	MEEDH	TYE	196
ITAM 패턴													
hCD79b	198	GLDIDQ	TATYED	IVTL	R	TGEV	KWSV	GEHP	GQE	229	시열2		
CynCD79b	200	GLDIDQ	TATYED	IVTL	R	TGEV	KWSV	GEHP	GQE	231	시열7		
mCD79b	197	GLNIDQ	TATYED	IVTL	R	TGEV	KWSV	GEHP	GQE	228	시열8		

도면19

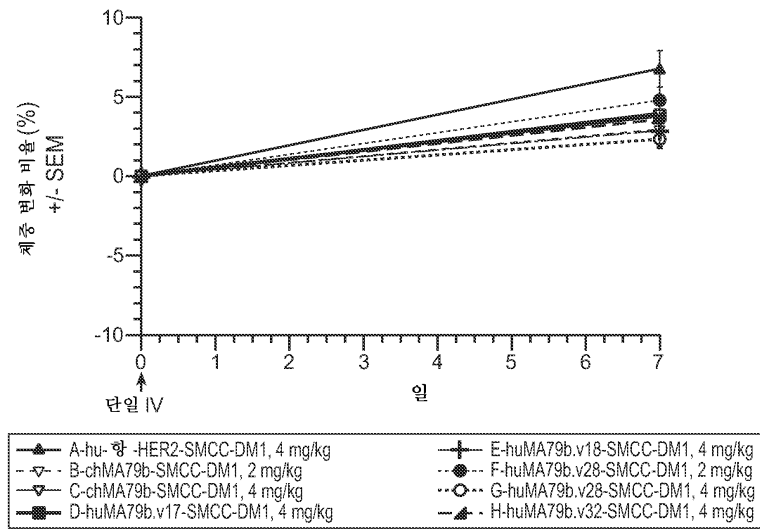
도면20



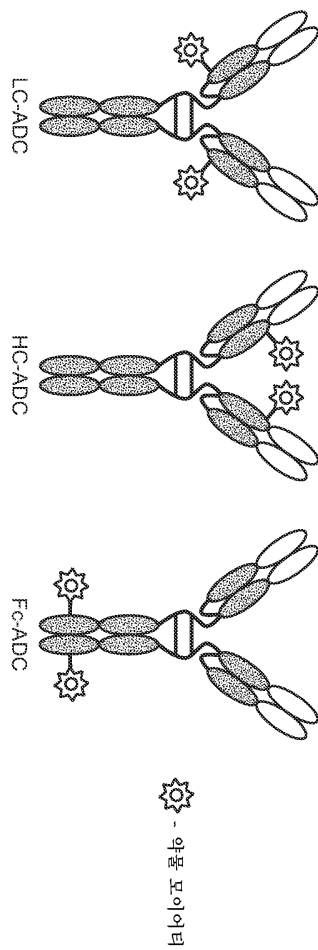
도면21a



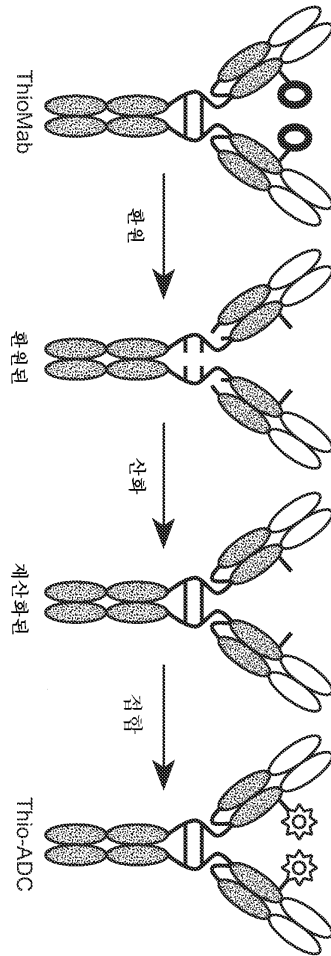
도면21b



도면22



도면23



도면24

항-CD79b A118C huMA79b.v17 시스테인 조작된 중쇄 ThioMab

A. 경쇄 서열

Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCASQSVDDYDGSFLNWDYQKPKGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (서열 229)

B. 중쇄 서열

Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSAD
TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGGTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (서열 228)

도면25

항 -CD79b A118C huMA79b.v18 시스테인 조작된 중쇄 ThioMAb

A. 경쇄 서열

Thio-huMA79b.v18-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSTFLNWWYQOKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GGSTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSNEEDPLTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (서열 231)

B. 중쇄 서열

Thio-huMA79b.v18-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTIVTVSSCSTKGPSTVFPPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVPFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPG (서열 230)

도면26

항 -CD79b A118C huMA79b.v28 시스테인 조작된 중쇄 ThioMAb

A. 경쇄 서열

Thio-huMA79b.v28-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYEGDSFLNWWYQOKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GGSTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSNEEDPLTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (서열 233)

B. 중쇄 서열

Thio-huMA79b.v28-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTIVTVSSCSTKGPSTVFPPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVPFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPG (서열 232)

도면27

항 -CD79b V205C chMA79b 시스테인 조작된 경쇄 ThioMAb

A. 경쇄 서열

Thio chMA79b-LC-V205C (LC)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSTFLNWWYQOKPGQPKLFIYAASNLESGIPARFSGS
GGSTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEEDPLTFGAGTELELKRVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PCTKSFNRGEC (서열 235)

B. 중쇄 서열

Thio chMA79b-LC-V205C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYIEWVWKQRPGLGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKPKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSTVFPPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVPFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPG (서열 234)

도면28

항-CD79b A118C chMA79b 시스테인 조작된 중쇄 ThioMAb

A. 경쇄 서열

Thio chMA79b-HC-A118C (LC)

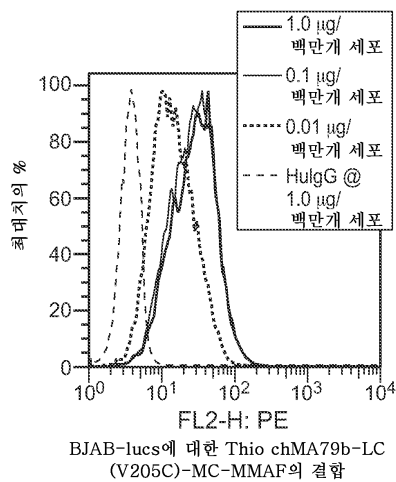
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSTFLNWDYQKPGQPPKLFYIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQSNEDPLTFGAGTELELKRITVAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (서열 237)

B. 중쇄 서열

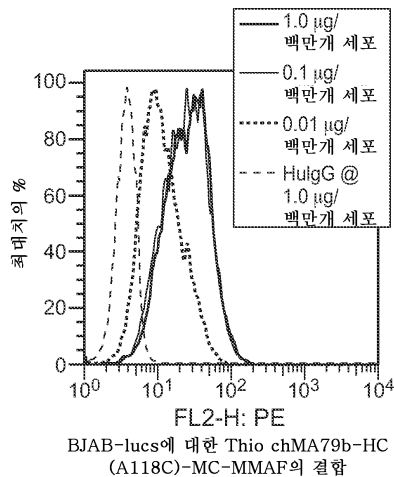
Thio chMA79b-HC-A118C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYIEWVKQRPGHLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSTVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVVDYFPEFVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 236)

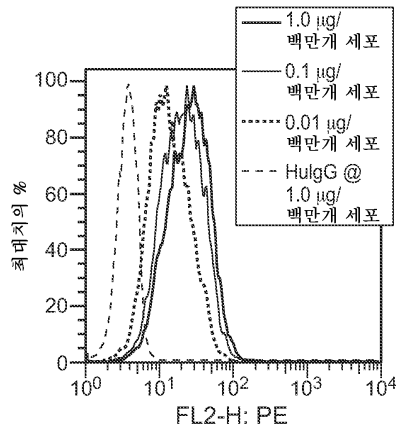
도면29a



도면29b

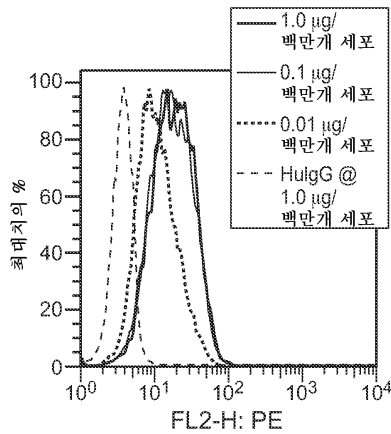


도면30a



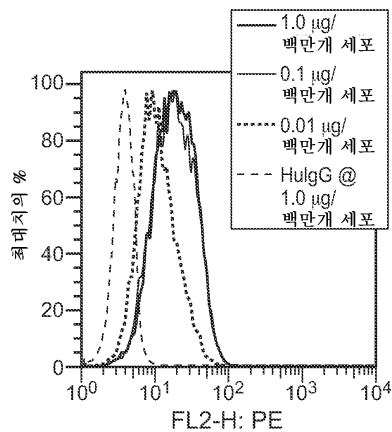
BJAB-luc에 대한 네이키드 Thio MA79b.v18-HC (A118C)의 결합

도면30b



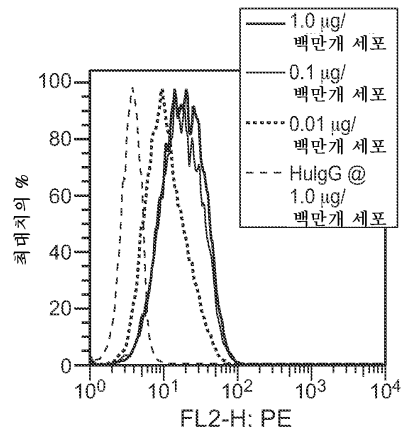
BJAB-luc에 대한 Thio MA79b.v18-HC (A118C)-MC-MMAF의 결합

도면30c



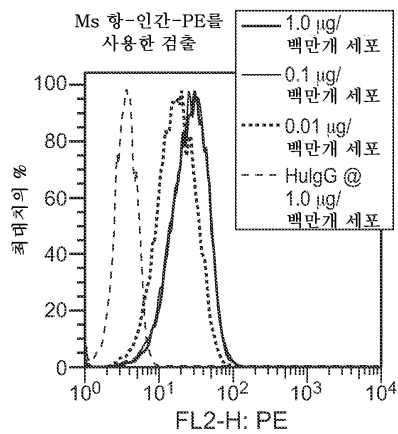
BJAB-luc에 대한 Thio MA79b.v18-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE의 결합

도면30d



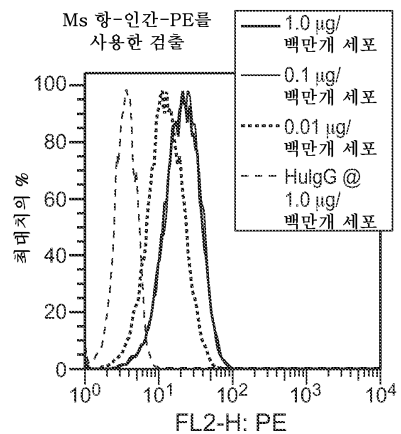
BJAB-luc8에 대한 Thio MA79b.v18-HC (A118C)-BMPEO-DM1의 결합

도면31a



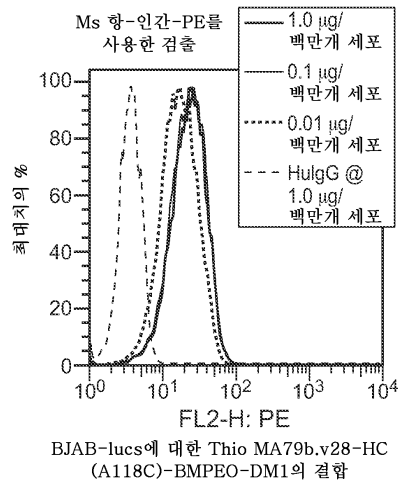
BJAB-luc8에 대한 네이키트 Thio MA79b.v28-HC (A118C)의 결합

도면31b

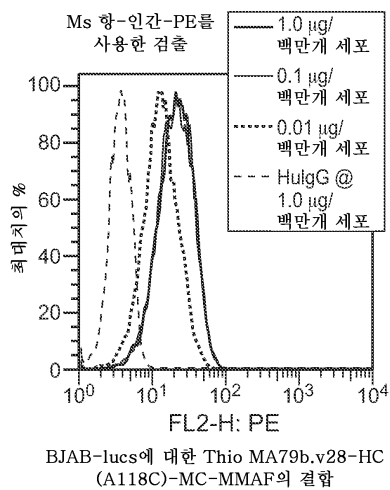


BJAB-luc8에 대한 Thio MA79b.v28-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE의 결합

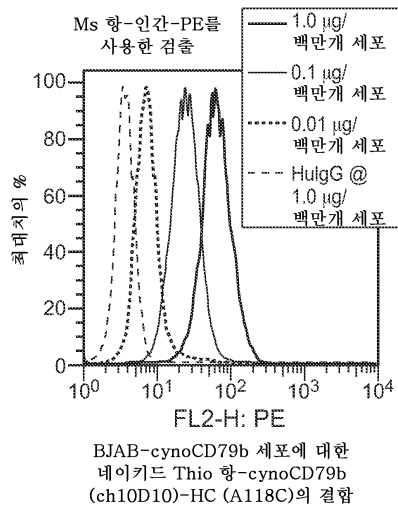
도면31c



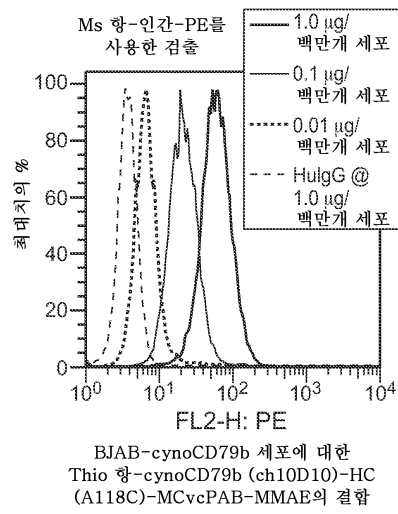
도면31d



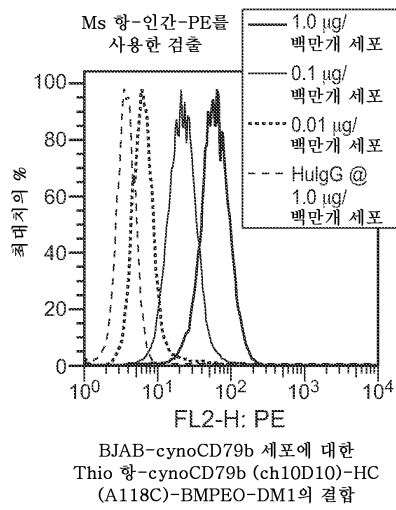
도면32a



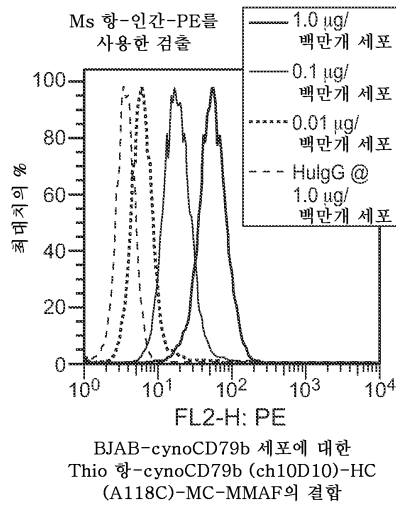
도면32b



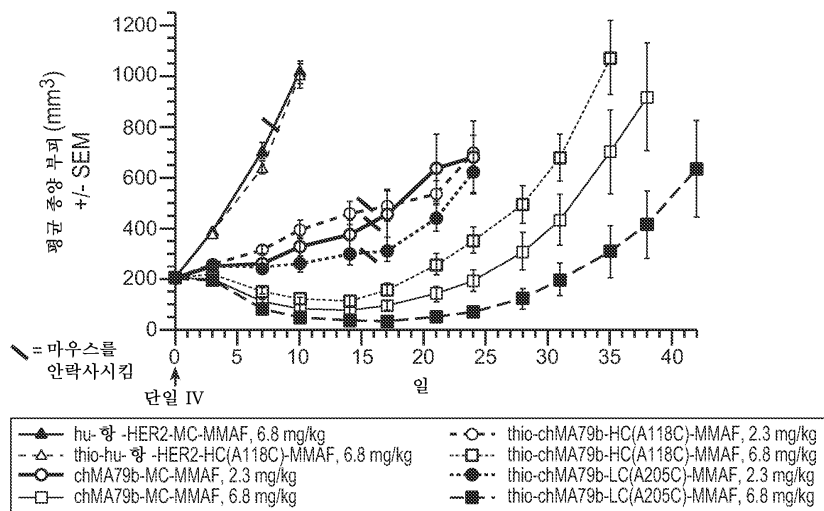
도면32c



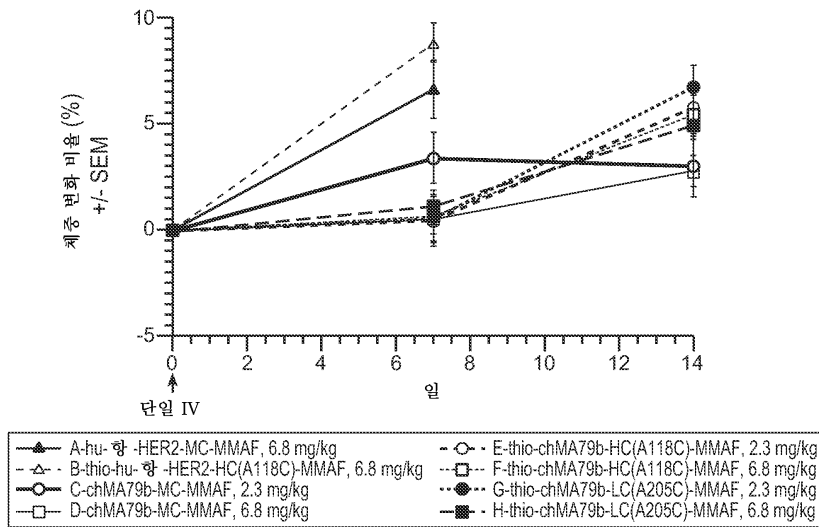
도면32d



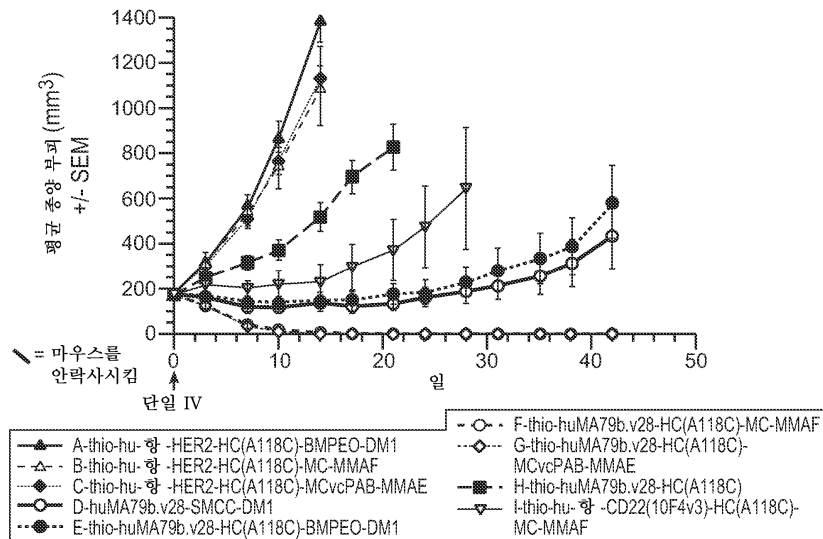
도면33a



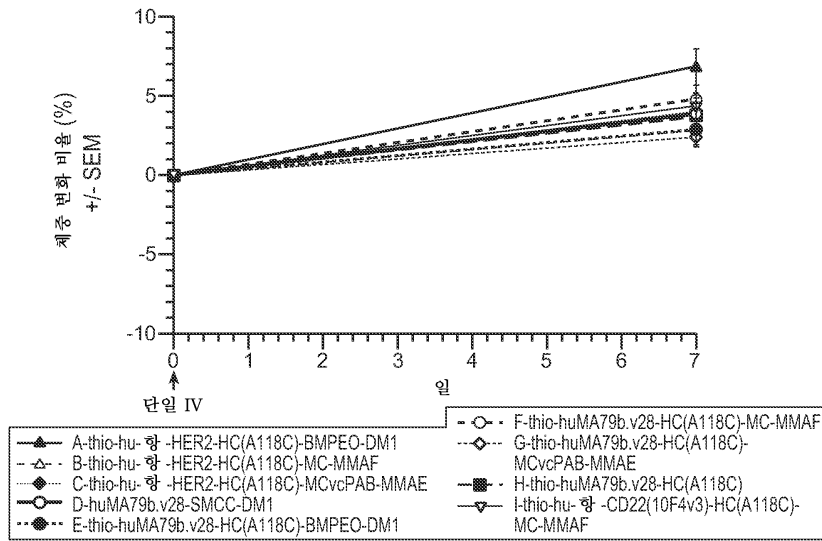
도면33b



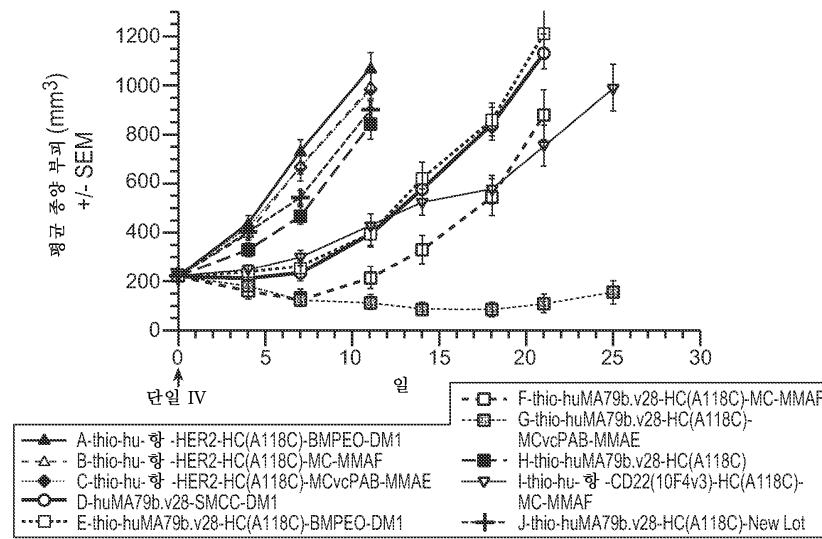
도면34a



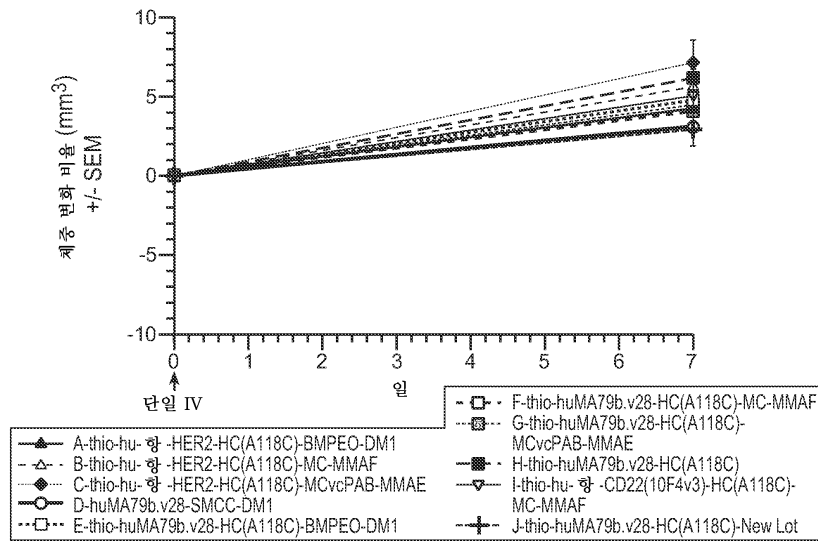
도면34b



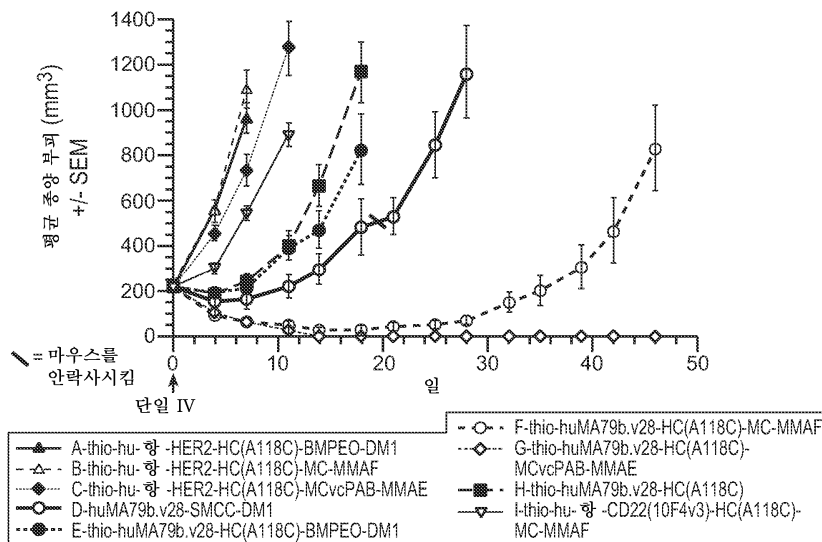
도면35a



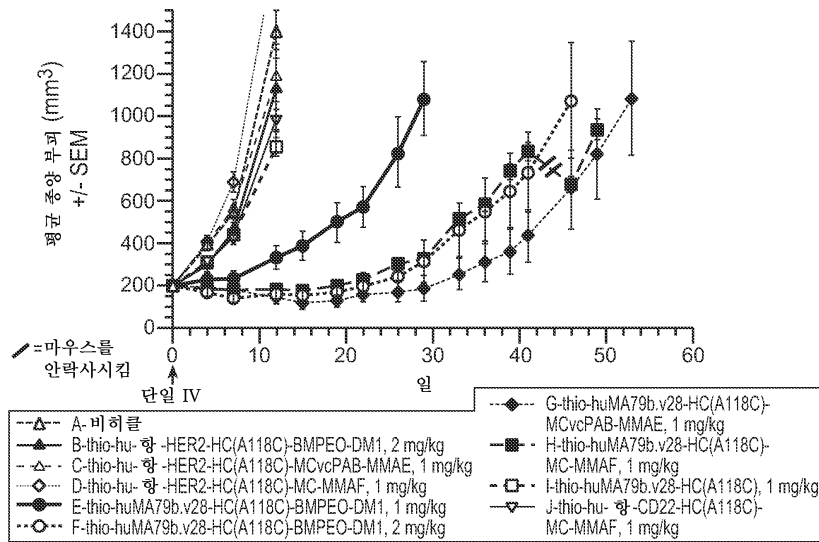
도면35b



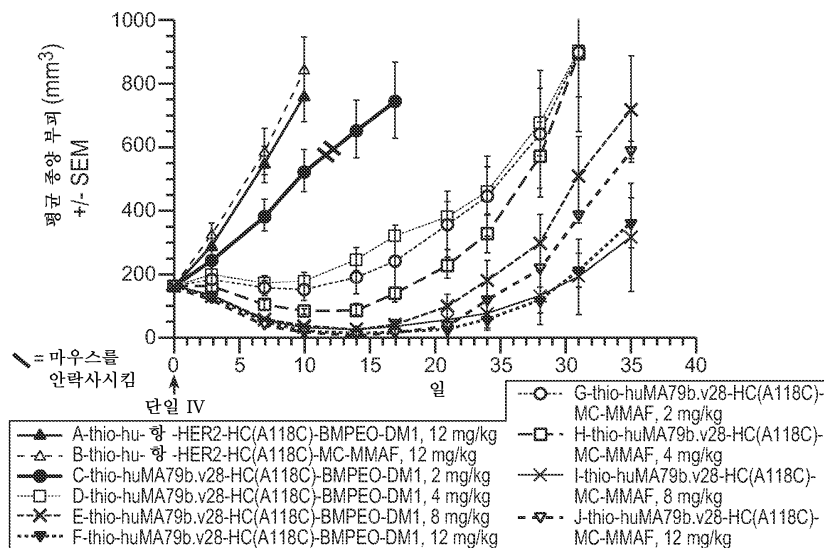
도면36



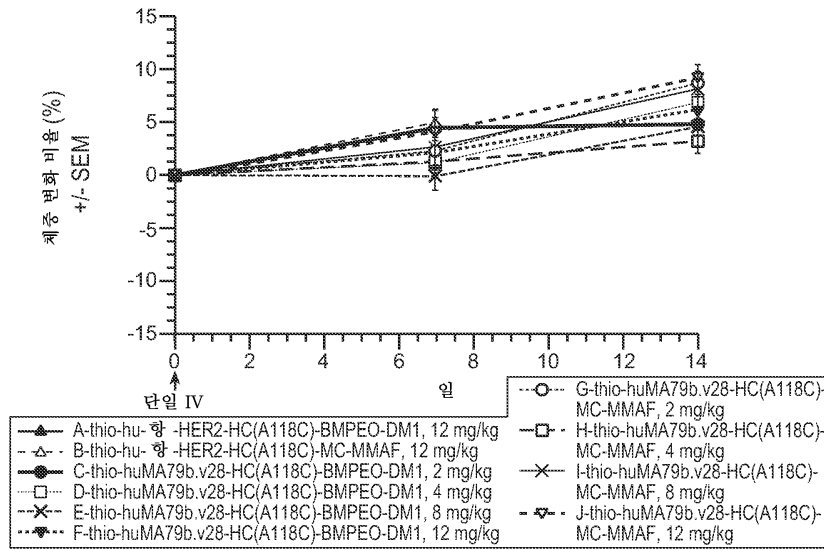
도면37



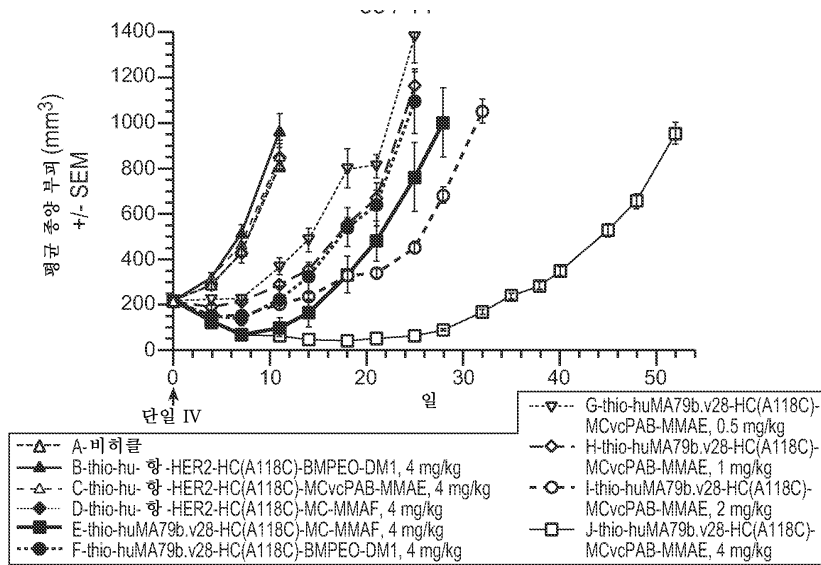
도면38a



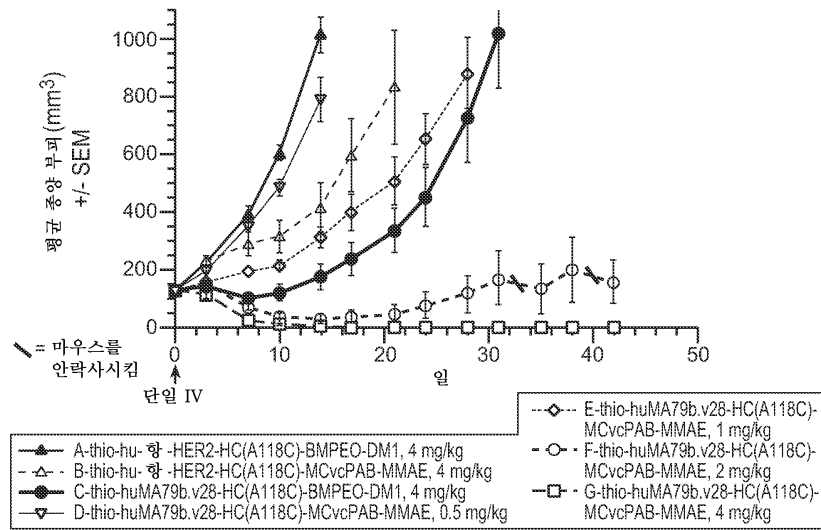
도면38b



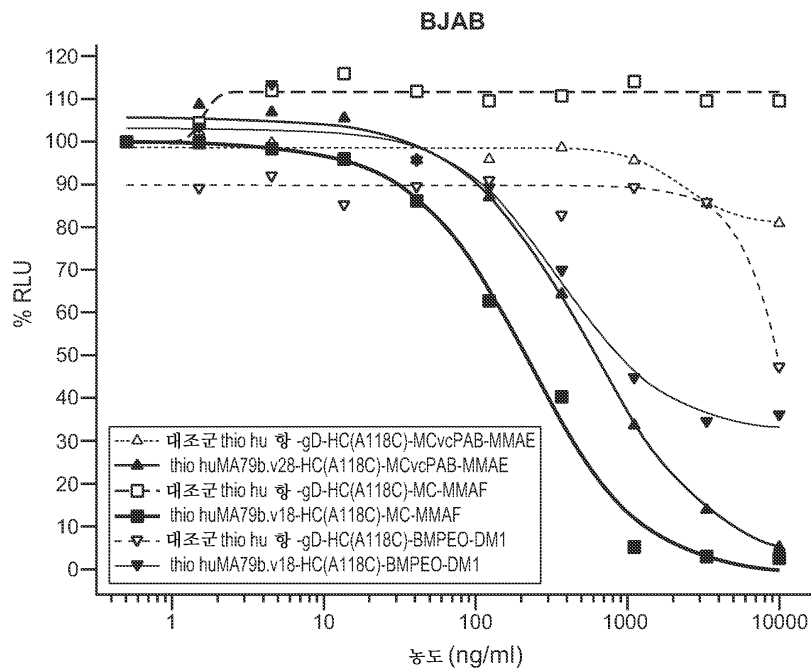
도면39



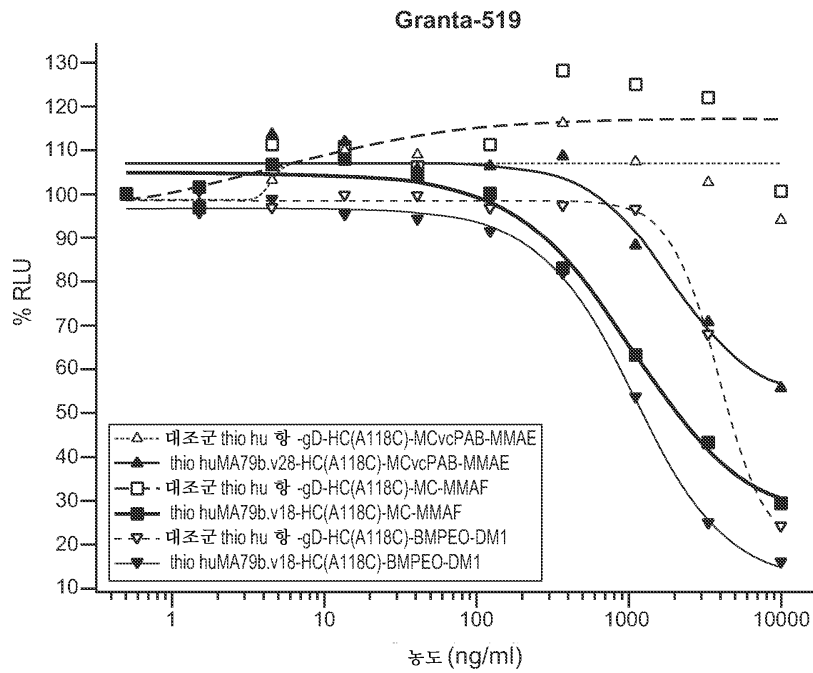
도면40



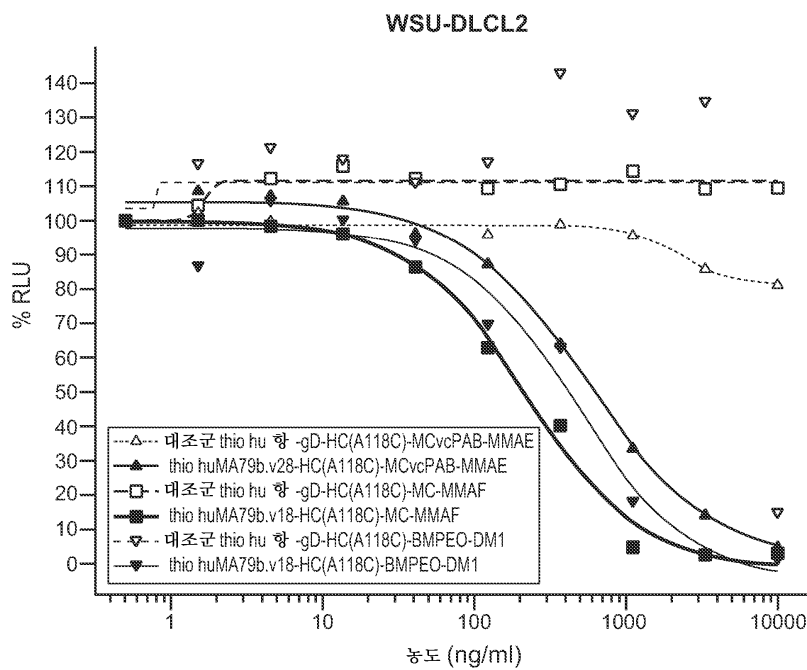
도면41a



도면41b



도면41c



도면42

<p1.cynoCD79b

TCATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGG
 CTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAT
 TGCCCTTGGGGACAGAGCAGTGACCAATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGTGTCCAGGCCACTGGC
 TGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCAGCTGAGCCAGTGCCAGCAGCCAAATCAGAGGACCTG
 TACCCGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTCTCGGATCTGGCAGAGCCACGTTTCATAGCCAGGAA
 ACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACGTGACCAACAGCACCTTCAGCATCGTGAGCTGGC
 TCCGGAAGCGGGAGACGGACAAGGAGCCCAACAGGTGAACCTGGAGCAGGGCCACATGCATCAG
 ACCCAAACAGCTCTGTCAACACCTCATCATCCAAGACATCCGGTTTGAGGACAACGGCATCTA
 CTTCTGTTCAGCAGGAGTGACAGCAAGACCTCGGAGGTCTACCGGGGCTGCGGCACGGAGCTGCGAG
 TCATGGGGTTTCAGCACCTTGGCACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGCATCATCATG
 ATCCAGACGCTGCTGATCATCCTCTTCATCATCGTGCCCATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGA
 CAGCAAGGCCCGGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACGGCCACCT
 ACGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTGGGTGAGCACCCAGGTCAG
 GAGTGAAGAGCCAGGACCTCCCCACGGCCTGGGTGCAGGCTCCCCAGCC

도면43

<p1.cynoCD79b

DNA548455

MARLALSPVSSHVLVALLLLLSAAEPVPAKSEDLYPNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
 VKMHCVVTNSTFSIVSWLRKRETDKEPQQVNLEQGHMHQTQNSSVTLLIIQDIRFEDNGIY
 FCQQECSKTSEVYRGCGTELVRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLL
 DKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

신호 서열.

아미노산 1-26.

막횡단 도메인.

아미노산 161-181.

면역글로불린 도메인.

아미노산 59-126.

면역수용체 티로신계 활성화 모티프.

아미노산 195-215.

면역글로불린 V-세트 도메인.

아미노산 44-145.

N-글리코실화 부위.

아미노산 70-73, 103-106.

cAMP- 및 cGMP-의존 단백질 키나제 인산화 부위.

아미노산 81-84.

단백질 키나제 C 인산화 부위.

아미노산 50-52, 61-63, 84-86, 158-160, 214-216.

카제인 키나제 II 인산화 부위.

아미노산 22-25, 84-87, 158-161, 208-211, 223-226.

티로신 키나제 인산화 부위.

아미노산 115-122.

N-미리스토일화 부위.

아미노산 41-46, 120-125.

도면44

키메라 항 -CYNO CD79b (ch10D10) 경쇄

ACCTCGGTTTC TATCGATTGA ATTCCACCAAT GGGATGGTCA TGTATCATCC TTTTCTAGT
 AGCAACTGCA ACTGGAGTAC ATTACAGATAT CGTGCTGACC CAATCTCCAC CCTCTTTGGC
 TGTGTCTCTA GGGCAGAGGG CCACCATATC CTGCAGAGCC AGTGAAAGTG TTGATAGTTA
 TGGCAAAACT TTTATGCACT GGCACCAGCA GAAACCAGGA CAGCCACCCA AACTCCTCAT
 CTATCGTGTA TCCAACCTAG AATCTGGGAT CCCTGCCAGG TTCAGTGGCA GTGGGTCAAG
 GACAGACTTC ACCCTCACCA TTAATCCTGT GGAGGCTGAT GATGTTGCAA CCTATTACTG
 TCAGCAAAGT AATGAGGATC CGTTCACGTT CGGTGGAGGC ACCAAGCTGG AAATCAAACG
 GACCGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG
 AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTACAG AGCAGGACAG
 CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA
 ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG
 CTTCAACAGG GGAGAGTGT AAGCTTGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA
 TAATGGTTAC AAATAAAGCA

도면45

키메라 항 -CYNO CD79b (ch10D10) 경쇄

DIVLTQSPFSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHHQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
 FSGSGSRRTDFTLTINPVEADDAVATYYCQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

도면46

키메라 항 -CYNO CD79b (ch10D10) 중쇄

CACCTCGGTT CTATCGATTG AATTCCACCA TGGGATGGTC ATGTATCATC CTTTTCTAG
 TAGCAACTGC AACTGGAGTA CATTACAGAAG TTCAGCTGCA GGAGTCGGGA CCTGGCCTGG
 TGAAACCTTC TCAGTCTCTG TCCCTCACCT GCACTGTAC TGGCTACTCA ATCACCAGTG
 ATTATGCCTG GAACTGGATC CGGCAGTTTC CAGGAAACAA ACTGGAGTGG ATGGGCAACA
 TATGGTACAG TGGTAGCACT ACCTACAACC CATCTCTCAA AAGTCGAATC TCTATCACTC
 GAGACACATC CAAGAACCAG TTCTTCCTGC AGTTGAATTC TGTGACTTCT GAGGACACAG
 CCACATATTA CTGTTCAAGA ATGGACTTCT GGGGTCAAGG CACCACTCTC ACAGTCTCCT
 CAGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCTCCAAG AGCACCTCTG
 GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCTTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT
 CGTGGAACCTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGCTGTC CTACAGTCTC
 CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CTGTGCCCTC TAGCAGCTTG GGCACCCAGA
 CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC
 CCAAATCTTG TGACAAAACCT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCTGGGGG
 GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC
 CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT
 GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA
 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
 CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAAG
 AGATGACCAA GAACCAAGTC AGCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA
 TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCTCCCG
 TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
 GGCACAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTTACA
 CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGAGTGCG ACGGCCCTAG AGTCGACCTG
 CAGAAGCTTG GCCGCCATGG CCCAATTGTG TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA

도면47

키메라 항 -CYNO CD79b (ch10D10) 중쇄

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
 SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTS EDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKALPA
PIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTT
PVLDSGDSFLYSLKTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

도면48

항-cyno CD79b ch10D10 A118C 시스테인 조작된 중쇄 ThioMAb

A. 경쇄 서열

Thio- 항 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (LC)

DIVLTQSPSPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHHWQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (서열 245)

B. 중쇄 서열

Thio- 항 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (HC)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPNGKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 244)

도면49

항 -cyno CD79b ch10D10 V205C 시스테인 조작된 경쇄 ThioMAb

A. 경쇄 서열

Thio- 항 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (LC)

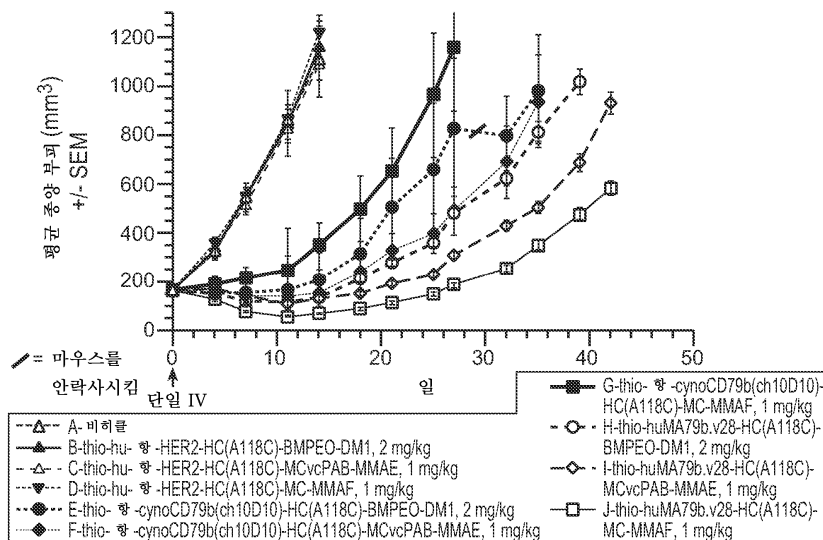
DIVLTQSPSPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHHWQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (서열 300)

B. 중쇄 서열

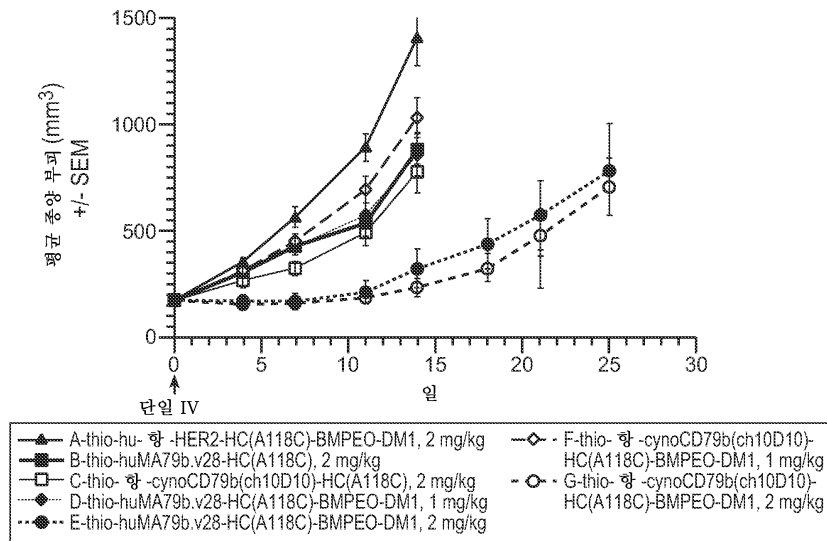
Thio- 항 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (HC)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPNGKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 299)

도면50



도면51



서열 목록

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.

Chen, Yvonne

Dennis, Mark

Dornan, David

Elkins, Kristi

Junutula, Jagath Reddy

Polson, Andrew

Zheng, Bing

<120> ANTI-CD79B ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF USE

<130> P5111R1-1 WO

<150> US 61/025,137

<151> 2008-01-31

<150> US 61/032,790

<151> 2008-02-29

<150> US 61/054,709

<151> 2008-05-20

<160> 310

<210> 1

<211> 1270

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50
tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100
aggctggcgt tgtctcctgt gcccagccac tggatgggtg cgttgctgct 150
gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccggtacc 200
ggaatcccaa aggtagtgtg ttttcgcgga tctggcagag cccacgttcc 250
atagccagga aacggggctt cacggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300
cgctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350
cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaaagatc ccagaacgaa 400
tctctcgcca cctcaccat ccaaggcatc cgttttgagg acaatggcat 450

ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcgagggtc taccagggtc 500
gcggcacaga gctgcgagtc atgggattca gcaccttggc acagctgaag 550
cagaggaaca cgctgaagga tggatcatc atgatccaga cgctgctgat 600
catcctcttc atcatctgc ctatcttct gctgctggac aaggatgaca 650
gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgaggccct ggacattgac 700
cagacagcca cctatgagga catagtacg ctgcggacag ggaagtga 750
gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800
tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttc gagctgcctg 850
gtcatggcc caacccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900

gccacacaga gctgccattt gtctccagc cctgggtccc agctcttgcc 950
aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttg agggagtct 1000
ctggggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050
ccccacacat gggatggggg aggcagagac tgggtccagag cccgcaaatg 1100
gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150
aactgggccc cagaagagcc acaggaacat cattccttc ccgcaaccac 1200
tcccaccca gggaggccct ggctccagt gccttcccc gtggaataaa 1250
cggtgtgtcc tgagaaacca 1270

```

<210> 2

<211> 229

<212> PRT

<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> 929

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Light Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 3

cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg 50
ggatggtcac gtatcaccct ttttctagta gcaactgcaa ctggagtaca 100

ttcagatata gtgtgaccc aatctccagc ttctttggct gtgtctctgg 150
ggcagagggc caccatctcc tgcaaggcca gccaaagtgt tgattatgat 200
ggtgatagtt ttttgaactg gtaccaacag aaaccaggac agccacccaa 250
actcttcacg tatgtgcat ccaatctaga atctgggacg ccagccaggt 300
ttagtggcag tgggtctggg acagacttca ccctcaacat ccacctctgt 350
gaggaggagg atgtgcaac ctattactgt cagcaaagta atgaggatcc 400
gtcacgttc ggggcaggca ccgagctgga actcaaacgg accgtggctg 450
caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 500
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa 550

agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 600
gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 650
ctgacgtga gaaagcaga ctacagaaa cacaagctct acgcctgcga 700
agtcacccat cagggcctga gctcgcccg cacaagagc ttcaacaggg 750
gagagtgtta agcttgccg ccattggcca actgttttat tgcagcttat 800
aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcaca ataaagcatt 850
tttttactg cattctagtt gtggttgtc caaactcacc aatgtatctt 900
atcatgtctg gatcggaat taattcggc 929

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213>

Artificial sequence

<220><223> Light Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 4

```

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

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

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

          185          190          195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
          200          205          210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          215

```

<210> 5

<211> 1469

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 5

```

tcggttctat cgattgaatt ccacatggg atggtcatgt atcatccttt 50
ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt cagaagtcca gctgcagcag 100
tctggggctg aactgatgaa gcctggggcc tcagtgaaga tatcctgcaa 150

ggctactggc tacacattca gtagttactg gatagagtgg gtaaagcaga 200
ggcctggaca tggccttgag tggattggag agattttacc tggaggtggt 250
gatactaact acaatgagat tttcaagggc aaggccacat tcactgcaga 300
tatactctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg 350
actctgccgt ctattactgt acaagacgag taccggttta ctttgactac 400
tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcctcca ccaaggggccc 450
atcggtcttc ccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag 500
cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 550
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt 600

cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg actgtgccct 650
ctagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 700
agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 750
tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag 800
tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 850
cctgaggtea catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt 900
caagttaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa 950
agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 1000
accgtctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt 1050

ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 1100
aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccgggaa 1150
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggtttcta 1200
tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1250
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1300

```

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 1350
 ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga 1400
 gcctctccct gtctccgggt aaatgagtgc gacggcccta gattcgacct 1450
 gcagaagctt ggccgcat 1469

<210> 6

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 6

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly			
1	5	10	15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser			
	20	25	30
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu			
	35	40	45
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr			
	50	55	60
Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser			
	65	70	75
Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
	80	85	90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp			
	95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr			
	110	115	120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
	125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
	140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	155	160	165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
	170	175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
	185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
	200	205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	245	250
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	260	265
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	290	295
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
	305	310
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
	320	325
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	335	340
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
	350	355
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	365	370
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
	380	385
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		

395	400	405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
410	415	420
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
425	430	435
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
440	445	

<210> 7

<211> 231

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 7

Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Ser Ser His Trp Leu Val		
1	5	10
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> PRT

<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> PRT

<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> 111

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Variable domain of Light Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 10

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

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Variable Domain of LIght Chain of Humanized Antibody Graft (huMA79b graft)

<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 Ala Ser Gln Ser Val Asp

20 25 30

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

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

95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys

5 10

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<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> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable domain of Heavy Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser

65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp

	95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
	110	115	
<210> 15			
<211> 117			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Variable Domain of Heavy Chain of Humanized Antibody Graft (huMA79b graft)			
<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 Ser			
20 25 30			
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
35 40 45			
Glu Trp Val Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr			
50 55 60			
Asn Glu Ile Phe Lys Gly 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 Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp			
	95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	110	115	
<210> 16			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 16			
Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys			
1 5 10 15			

Lys

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 17

Lys Ala Ser Lys Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1

5

10

15

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 18

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser

5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 19

Ala Ala Ser Asn Leu Lys Ser

5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<

<400> 20

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Leu Thr

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 21

Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Leu Thr

5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 22

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Arg

5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 23

Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser

5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 24

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Asn

5

<210> 25

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 25
 Ala Ala Arg Lys Leu Lys Arg
 5
 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 26
 Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Arg
 5
 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 27
 Ala Ala Arg Lys Leu Lys Ser
 5
 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 28
 Ala Ala Arg Lys Leu Ala Ser
 5
 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 29

Ala Ala Gly Ile Leu Ala Arg

5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 30

Ala Ala Arg Lys Leu Arg Ser

5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 31

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Ser

5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 32

Ala Ala Arg His Leu Lys Arg

5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 33

Ala Ser Arg Tyr Leu Ser Arg

5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 34

Ala Gly Ser Lys Leu Leu Arg

5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 35

Ala Ala Ser Asn Arg Lys Ser

5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 36

Ala Ala Ser Lys Leu Gly Ser

5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 37

Ala Ala Arg Tyr Leu Arg Arg

5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 38

Ala Ala Arg Arg Leu Arg Thr

5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 39

Ala Ala Arg Arg Leu Gly Arg

5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 40

Ala Ala Arg Gln Arg Lys Arg

5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 41

Ala Ala Arg Lys Leu Leu Arg

5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 42

Ala Ala Arg Lys Leu Lys Asn

5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 43

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Thr

5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 44

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Gly

5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 45

Ala Ala Arg Lys Leu Ala Arg

5

<210> 46

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 46
 Gln Gln Ser Asn Ala Asp Pro Leu Thr
 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 47
 Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Leu Thr
 5

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 48
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
 5

<210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 49
 Gln Gln Ser Asn Asp Asp Pro Leu Thr
 5

<210> 50
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 50

Gln Gln Ser Asn Leu Asp Pro Leu Thr

5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 51

Asn Asn Ser Asn Gly Asp Pro Leu Asn

5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 52

Gln Pro Asp Asn Glu Ala Pro Arg Thr

5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 53

Asp Gln Arg Asn Ala Asp Pro Leu Thr

5

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 54

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Ser

5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 55

Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Gln

5 10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 56

Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 57

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 59

Gly Tyr Ser Phe Lys Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 60

Pro Tyr Ser Leu Cys Thr Tyr Phe Ile Asp
5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 61

Gly Tyr Tyr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 62

Gly Tyr Pro Phe Gly Arg Tyr Trp Val Asn

5	10
<210> 63	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220><223>	
Humanized Antibody Variant	
<400> 63	
Gly Tyr Thr Phe Lys Lys Tyr Trp Ile Glu	
5	10
<210> 64	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Humanized Antibody Variant	
<400> 64	
Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gln	
5	10
<210> 65	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Humanized Antibody Variant	
<400> 65	
Gly Tyr Pro Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu	
5	10
<210> 66	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Humanized Antibody Variant	
<400> 66	
Gly Tyr Pro Val Gly Arg Tyr Trp Ile Ser	
5	10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 67

Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 68

Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser

5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 69

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu Ser

5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 70

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223>

Humanized Antibody Variant

<400> 71

Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 72

Gly Tyr Thr Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 73

Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 74

Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 75

Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 76

Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Tyr Trp Leu Gln

5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 77

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 78

Gly Tyr Pro Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223>

Humanized Antibody Variant

<400> 79

Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Ser

5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 80

Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 81

Gly Tyr Pro Phe Arg Gly Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 82

Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 83

Gly Tyr Pro Phe Asn Gly Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 84

Gly Tyr Asn Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ser

5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 85

Gly Phe Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser

5 10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 86

Gly Phe Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223>

Humanized Antibody Variant

<400> 87

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp

	5	10
<210> 88		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Humanized Antibody Variant		
<400> 88		
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp		
	5	10
<210> 89		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Humanized Antibody Variant		
<400> 89		
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Lys Leu Asp		
	5	10
<210> 90		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Humanized Antibody Variant		
<400> 90		
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp		
	5	10
<210> 91		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Humanized Antibody Variant		
<400> 91		
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp		
	5	10
<210> 92		

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 92
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Phe Cys Leu Asp

5 10

<210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 93
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp

5 10

<210> 94
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 94
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp

5 10

<210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223>

Humanized Antibody Variant

<400> 95
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Lys Leu Asp

5 10

<210> 96
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Humanized Antibody Variant
 <400> 96
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Phe Asp
 5 10

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 97

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
 5 10

<210> 98

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 98

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Ser
 5 10

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 99

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Val Leu Asp
 5 10

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 100

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Leu Asp

5 10

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 101

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Phe Asp

5 10

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 102

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Phe Leu Asp

5 10

<210> 103

<211> 10

<212>

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 103

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp

5 10

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 104

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp

5 10

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 105

Cys Thr Arg Arg Arg Pro Val Cys Leu Asp

5 10

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Humanized Antibody Variant

<400> 106

Cys Thr Arg Arg Ile Pro Val Tyr Phe Asp

5 10

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 107

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp

5 10

<210> 108

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

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> 109

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

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> 110

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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> 111

<211> 79

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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> 112

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

<210> 113

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

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> 114

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

```

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> 115

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

```

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> 116

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

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> 117

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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> 118

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

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> 119

<211> 79

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

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> 120

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

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> 121

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

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 Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 122

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

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> 123

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

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 Cys Ala Arg
65 70 75
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 124

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

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> 125

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

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> 126

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

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> 127

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

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> 128

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

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> 129

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

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	Tyr	Cys	Phe
Gly	Gln	Gly	Thr
65	70	75	

Lys Val Glu Ile Lys

80

<210> 130

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

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	Tyr	Cys	Phe
Gly	Gln	Gly	Thr
65	70	75	

Lys Val Glu Ile Lys

80

<210> 131

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR1-LC of huMA79b graft

<400> 131

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> HVR2-LC of huMA79b graft

<400> 132

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR3-LC of huMA79b graft

<400> 133

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr

5

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR1-HC of huMA79b graft

<400> 134

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 135

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR2-HC of huMA79b graft

<400> 135

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile

1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR3-HC of huMA79b graft

<400> 136

Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr

5 10

<210> 137

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b. V28)

<400> 137

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b. V28)

<400> 138

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr

5 10

<210> 139

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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> 140

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

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

1 5 10 15

<210> 141

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

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> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

5 10

<210> 143

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

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> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

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

5 10

<210> 145

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5 10

<210> 147

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3-HC Composite of Humanized Antibody Variants

<220><221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is A or R

<220><221> Xaa

<222> 8

<223> Xaa is T or N

<220><221> Xaa

<222> 13

<223> Xaa is A or L

<400> 147

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> 148

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

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> 149

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

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> 150

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

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> 151

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

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> 152

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 152

Asp Ile Gln Leu 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> 153

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-LC Humanized Antibody variant huMA79b.v17)

<400> 153

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

1 5 10 15
<210> 154

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-LC of Humanized Antibody variant (huMA79b.v17)

<400> 154

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> 155

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 155

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

5 10
<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 156

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 157

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 158

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr

5

<210> 159

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 159

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> 160

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 160

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> 161

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 161

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 162

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 162

Arg Ala Thr Phe 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> 163

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 163

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5 10

<210> 164

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 164

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 165

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 165

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile

1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR-H3 of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 166

Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Phe	Asp	Tyr
			5						10

<210> 167

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH1-HC of Humanized Antibody Variet (huMA79b.v17)

<400> 167

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> 168

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 168

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> 169

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LC-HC Variety Domain of Humanized Antibody Variet(huMA79b.v17)

<400> 169

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

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

110

<210> 170

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 170

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 Ser		

20 25 30
 Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
 95 100 105
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 171

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 171

Asp Ile Gln Leu 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> 172

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 172

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

1 5 10 15

<210> 173

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 173

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> 174

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 174

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

<210> 175

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 175

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn
1				5					10				15	

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 176

Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser

5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 177

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr

5

<210> 178

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 178

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> 179

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 179

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> 180

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 180

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				5					10			

<210> 181

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 181

Arg	Ala	Thr	Phe	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> 182

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 182

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5 10

<210> 183

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 183

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 184

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 184

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile

1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 185

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr

5 10

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 186

```

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> 187

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 187

```

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> 188

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 188

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

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

35 40 45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

50 55 60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65 70 75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly

95 100 105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 189

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 189

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 Ser
20 25 30

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp

95 100 105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115

<210> 190

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 190

Asp Ile Gln Leu 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> 191

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 191

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

1 5 10 15

<210> 192

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 192

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> 193

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 193

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

5 10

<210> 194

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><

223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 194

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 195

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 195

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 196

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr

5

<210> 197

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 197

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> 198

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 198

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> 199

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 199

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

5 10

<210> 200

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 200

Arg Ala Thr Phe 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> 201

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 201

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5 10

<210> 202

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 202

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu

5 10

<210> 203

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-HLC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 203

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
 1 5 10 15
 Phe Lys Gly

<210> 204

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 204

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 205

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 205

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> 206

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.V28)

<400> 206

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> 207

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LC-variable domain of (huMA79b.v28)

<400> 207

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

<210> 208

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody (huMA79b.v28)

<400> 208

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 Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp

95 100 105

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

110 115

<210> 209

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 209

Asp Ile Gln Leu 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> 210

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 210

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

1 5 10 15

<210> 211

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 211

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> 212

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 212

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

5 10

<210> 213

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400>

> 213

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 214

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 214

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 215

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr

5

<210> 216

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 216

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> 217

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 217

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> 218

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 218

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

5	10

<210> 219

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 219

Arg Ala Thr Phe 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> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 221

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 221

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 222

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 222

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15
Phe Lys Gly

<210> 223

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 223

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
5 10

<210> 224

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 224

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> 225

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 225

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	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> 226

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LC -Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 226

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

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

95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 227

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 227

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 Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50	55	60
Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp		
95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
110	115	

<210> 228

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ThioMAb-huMA79b.v17-HC(A118C) Variant - HC

<400> 228

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 Ser
20 25 30
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60
Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
95 100 105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr
110 115 120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
155	160	165
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
170	175	180
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
200	205	210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
320	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
350	355	360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 229

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ThioMAb-huMA79b.v17-HC(A118C) Variant - LC

<400> 229

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

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

<210> 230

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<

220<223> ThioMAb-huMA79b.v18-HC(A118C) Variant - HC

<400> 230

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 Ser
20 25 30
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60
Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp		
95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr		
110	115	120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
155	160	165
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
170	175	180
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
200	205	210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
320 325 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
335 340 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
350 355 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380 385 390

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

395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 231

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ThioMAb-huMA79b.v18-HC(A118C) Variant - LC

<400> 231

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

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

50	55	60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
65	70	75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
80	85	90
Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly		
95	100	105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe		
110	115	120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser		
125	130	135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
140	145	150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
155	160	165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
170	175	180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
185	190	195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
200	205	210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
215		
<210> 232		
<211> 446		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> ThioMAb-huMA79b.v28-HC(A118C) Variant - HC		
<400> 232		
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 Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp

95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

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

185 190 195

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

200 205 210

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

215 220 225

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

230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
320	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
350	355	360
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
365	370	375
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
380	385	390
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
395	400	405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
410	415	420
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
425	430	435
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
440	445	

<210> 233

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ThioMAb-huMA79b.v28-HC(A118C) Variant - LC

<400> 233

```

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

Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
          35           40           45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
          50           55           60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          65           70           75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
          80           85           90
Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
          95           100          105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
          110          115          120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
          125          130          135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
          140          145          150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
          155          160          165

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

```

<210> 234

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<

220><223> ThioMAb-chMA79b- LC(V205C) Variant - HC

<400> 234

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser

65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp

95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

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

185 190 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys			
	200	205	210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
	215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
	305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
	320	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys			
	350	355	360
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	365	370	375
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	380	385	390
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	395	400	405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
	410	415	420
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
	425	430	435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

440

445

<210> 235

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ThioMAb-chMA79b- LC(V205C) Variant - LC

<400> 235

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

35

40

45

Gln Pro Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

50

55

60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65

70

75

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

80

85

90

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

95

100

105

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

110

115

120

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

125

130

135

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

140

145

150

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

155

160

165

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

170

175

180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 236

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ThioMAb-chMA79b- HC(A118C) Variant - HC

<400> 236

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

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser

65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp

95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

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

185 190 195

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

200 205 210

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

215 220 225

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

230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

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

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

320 325 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

335 340 345

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

350 355 360

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

365 370 375

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

380 385 390
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395 400 405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

425 430 435
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

440 445
<210> 237
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> ThioMAb-chMA79b- HC(A118C) Variant - LC
<400> 237

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

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

95 100 105
Thr Glu Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

125	130	135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
140	145	150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
155	160	165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
170	175	180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
185	190	195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
200	205	210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

215

<210> 238

<211> 893

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<

400> 238

tcattggtgat ggtgatgatg accggtacgc gtagaatcga gaccgaggag 50
 agggttaggg ataggcttac cttegaaccg cgggccctct agactcgagc 100
 ggccgccact gtgctggata tctgcagaat tgcccttggg gacagagcag 150
 tgaccatggc caggctggcg ttgtctcctg tgtccagcca ctggctggtg 200
 gcgttgctgc tgcgtctctc agcagctgag ccagtgccag cagccaaatc 250
 agaggacctg taccgaatc ccaaagtag tgcttgttct cggatctggc 300
 agagcccacg ttcatagcc aggaaacggg gttcacggt gaaaatgcac 350
 tgctacgtga ccaacagcac cttcagcatc gtgagctggc tccggaagcg 400
 ggagacggac aaggagcccc aacaggtgaa cctggagcag ggccacatgc 450

atcagaccca aaacagctct gtcaccacc tcattcatcca agacatccgg 500
 tttaggaca acggcatcta cttctgtcag caggagtga gcaagacctc 550
 ggaggtctac cggggtgcg gcacggagct gcgagtcag gggttcagca 600
 ccttggcaca gctgaagcag aggaacacgc tgaaggatgg catcatcatg 650
 atccagacgc tgcgtatcat cctcttcac atcgtgccca tcttctgct 700

gctggacaag gatgacagca aggccggcat ggaggaagat cacacctacg 750
 agggcctgga cattgaccag acggccacct acgaggacat agtgacgctg 800
 cggacagggg aagtgaagtg gtctgtgggt gagcaccag gtcaggagtg 850
 agagccagga cctccccacg gcctgggtgc aggctcccca gcc 893

<210> 239

<211> 231

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 239

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 Glu 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> 240

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10)- LC

<400> 240

acctcggttc tatcgattga attccacat gggatgggtca tgtatcatcc 50

tttttctagt agcaactgca actggagtagc attcagatat cgtgctgacc 100

caatctccac cctctttggc tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatc 150

ctgcagagcc agtgaaagtg ttgatagtta tggcaaaact tttatgcact 200

ggcaccagca gaaaccagga cagccaccca aactcctcat ctatcgtgta 250

tccaacctag aatctgggat cctgccagg ttcagtggca gtgggtcaag 300

gacagacttc accctcacca ttaatcctgt ggaggctgat gatgttgcaa 350

cctattactg tcagcaaagt aatgaggatc cgttcacgtt cggtggagggc 400

accaagctgg aaatcaaagc gaccgtggct gcaccatctg tcttcatctt 450

cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc 500

tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 550

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 600

caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 650

actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 700

agtcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aagcttggcc 750

gccatggccc aacttggtta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 800

<210> 241

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10)- LC

<400> 241

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser

50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe

65 70 75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr

80 85 90

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

95 100 105

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

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

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

185 190 195

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

200

205

210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

215

<210> 242

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10)- LC

<400> 242

```

caccctcggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc 50
ctttttctag tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctgca 100
ggagtcggga cctggcctgg tgaaaccttc tcagtctctg tcctcacct 150
gcactgtcac tggtactca atcaccagtg attatgcctg gaactggatc 200
cggcagtttc caggaaacaa actggagtgg atgggcaaca tatggtacag 250
tggtagcact acctacaacc catctctcaa aagtcgaatc tctatcactc 300

gagacacatc caagaaccag ttcttctgc agttgaattc tgtgacttct 350
gaggacacag ccacatatta ctgttcaaga atggacttct ggggtcaagg 400
caccactctc acagtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc 450
ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggcctgggc 500
tgcttggtca aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc 550
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct 600
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ctgtgccctc tagcagcttg 650
ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa 700
ggtggacaag aaagttgagc ccaaattctg tgacaaaact cacacatgcc 750

caccgtgcc cagcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc 800
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcceggaccc ctgaggtcac 850
atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc aagttcaact 900
ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 950
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtcctgca 1000
ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1050
ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1100
cgagaaccac aggtgtacac cctgcccaca tccgggaag agatgaccaa 1150

```

gaaccaggtc agcctgacct gcctggtaaa aggtttctat cccagcgaca 1200

tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1250

acgcctcccc tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct 1300

caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1350

tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1400

tctccgggta aatgagtgcg acggccctag agtcgacctg cagaagcttg 1450

gccgccatgg cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaataaa 1500

<210> 243

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10)- LC

<400> 243

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

1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys

35 40 45

Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr

50 55 60

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

65 70 75

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly

95 100 105

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

110 115 120

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

125 130 135

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

140 145 150

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

155 160 165

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

170 175 180

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

185 190 195

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

200 205 210

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

215 220 225

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

230 235 240

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

245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

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

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

320 325 330

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

335 340 345

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

350 355 360

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

365 370 375
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

380 385 390
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

395 400 405
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

410 415 420
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

425 430 435
Leu Ser Leu Ser Pro Gly

440

<210> 244

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-MAb-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) Variant - HC

<400> 244

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

1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys

35 40 45

Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr

50 55 60

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

65 70 75

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly

95 100 105

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

110	115	120
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
125	130	135
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
140	145	150
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
155	160	165
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
170	175	180
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
185	190	195
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
200	205	210
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
215	220	225
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
230	235	240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
245	250	255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
320	325	330
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
335	340	345

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

350 355 360

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

365 370 375

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

380 385 390

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

395 400 405

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

410 415 420

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

425 430 435

Leu Ser Leu Ser Pro Gly

440

<210> 245

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-MAb-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) Variant - LC

<400> 245

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser

50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe

65 70 75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr

	80	85	90
Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly			
	95	100	105
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe			
	110	115	120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
	125	130	135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val			
	140	145	150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
	155	160	165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	170	175	180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
	185	190	195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
	200	205	210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	215		

<210

> 246

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Albumin binding peptide

<400> 246

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> 247

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Albumin binding peptide

<400> 247

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> 248

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Albumin binding peptide

<400> 248

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> 249

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Albumin binding peptide

<400> 249

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 250

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Albumin binding peptide

<400> 250

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

5 10

<210> 251

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 251

Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly

5 10

<210> 252

<211>

> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 252

Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Thr

5 10

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 253

Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val

5 10

<210> 254

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 254

Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys

	5	10
<210> 255		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Thio-huMA79b HC-variant		
<400> 255		
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro		
	5	10
<210> 256		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Thio-huMA79b HC-variant		
<400> 256		
Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val		
	5	10
<210> 257		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Thio-huMA79b HC-variant		
<400> 257		
Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala		
	5	10
<210> 258		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Thio-huMA79b HC-variant		
<400> 258		
Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu		
	5	10
<210> 259		

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 259

Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
5 10

<210> 260

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 260

Glu Val Gln Leu Cys Gln Ser Gly Ala Glu
5 10

<210> 261

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 261

Val Lys Ile Ser Cys Cys Ala Thr Gly Tyr Thr
5 10

<210> 262

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 262

Leu Ser Ser Leu Thr Cys Glu Asp Ser Ala Val
5 10

<210> 263

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 263

Thr Ser Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys

5 10

<210> 264

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 264

Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro

5 10

<210> 265

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 265

Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val

5 10

<210> 266

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 266

Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala

5 10

<210> 267

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 267

Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu

5 10

<210> 268

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 268

Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe

5 10

<210> 269

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 269

Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Pro Gly

5 10

<210> 270

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 270

Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Thr Gly Tyr Ser

5 10

<210> 271

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 271

Leu Asn Ser Val Thr Cys Glu Asp Thr Ala Thr

5 10

<210> 272

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 272

Thr Thr Leu Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys

5 10

<210> 273

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 273

Leu Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro

5 10

<210> 274

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 274

Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val

5 10

<210> 275

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-HC-variant

<400> 275

Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala

5 10

<210> 276

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 276

Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu

5 10

<210> 277

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 277

Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe

5 10

<210> 278

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 278

Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr

5 10

<210> 279

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 279

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val

5 10

<210> 280

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 280

Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro

5 10

<210> 281

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 281

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys

5 10

<210> 282

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b LC-variant

<

<400> 282

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val

5 10

<210> 283

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 283

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr

5 10

<210> 284

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 284

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn

5 10

<210> 285

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 285

Ser Leu Ala Val Ser Cys Gly Gln Arg Ala Thr

5 10

<210> 286

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 286

Glu Leu Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val

5 10

<210> 287

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b LC-variant

 $\angle$ $400 > 287$

Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro

5 10

<210> 288

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 288

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys

5 10

<210> 289

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 289

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val

5 10

<210> 290

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 290

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr

5 10

<210> 291

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 291

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn

5 10

<210> 292

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 292

Ser Leu Ala Val Ser Cys Gly Gln Arg Ala Thr

5 10

<210> 293

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 293

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val

5 10

<210> 294

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 294

Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro

5 10

<210> 295

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 295

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys

5 10

<210> 296

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 296

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val

5 10

<210> 297

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><

223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 297

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr

5 10

<210> 298

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 298

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn

5 10

<210> 299

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b-LC(V205C) Variant - HC

<400> 299

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

1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys

35 40 45

Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr

50	55	60
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser		
65	70	75
Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly		
95	100	105
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
110	115	120
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
125	130	135
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
140	145	150
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
155	160	165
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
170	175	180
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
185	190	195
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
200	205	210
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
215	220	225
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
230	235	240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
245	250	255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
320 325 330

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
335 340 345

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
350 355 360

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
365 370 375

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
380 385 390

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
395 400 405

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
410 415 420

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
425 430 435

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

<210> 300

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C) Variant - LC

<400> 300

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

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

Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
95 100 105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210

> 301

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-cynoCD79b (ch10D10) - variable of HC

<400> 301

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

<210> 302

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-cynoCD79b (ch10D10) - variable domain of LC

<400> 302

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

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
95 100 105
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
110

<210> 303

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain of huMA79bv.17

<400> 303

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
20 25 30
Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

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

185 190 195

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

200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

215

<210> 304

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain of huMA79bv.17

<400> 304

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 Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50 55 60

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

95 100 105

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

110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
155	160	165
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
170	175	180
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
200	205	210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
320	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		

350	355	360
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
365	370	375
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
380	385	390
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
395	400	405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
410	415	420
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
425	430	435
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
440	445	
<210> 305		
<211> 218		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Light chain of huMA79bv.18		
<400> 305		
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
1	5	10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp		
20	25	30
Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
35	40	45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser		
50	55	60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
65	70	75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
80	85	90

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

95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

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

185 190 195

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

200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

215

<210> 306

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<

220<223> Heavy chain of huMA79bv.18

<400> 306

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 Ser

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr

50	55	60
Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp		
95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
110	115	120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
155	160	165
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
170	175	180
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
200	205	210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
320 325 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
335 340 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
350 355 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 307

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain of huMA79bv.28

<400> 307

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

Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

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

125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 308

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain of huMA79bv.28

<400> 308

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 Ser			
	20	25	30
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
	35	40	45
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr			
	50	55	60
Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp			
	95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr			
	110	115	120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
	125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
	140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	155	160	165
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
	170	175	180
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr			
	185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys			
	200	205	210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
	215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			

230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
320	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
350	355	360
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
365	370	375
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
380	385	390
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
395	400	405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
410	415	420
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
425	430	435
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
440	445	

<210> 309

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain of huMA79bv.32

<400> 309

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

215

<210> 310

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain of huMA79bv.32

<400> 310

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 Ser

20	25	30
Ser Tyr Trp Ile	Glu Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly Leu

35	40	45
Glu Trp Ile Gly	Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly	Asp Thr Asn Tyr

50	55	60
Asn Glu Ile Phe	Lys Gly Arg Ala Thr Phe 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 Thr Arg Arg Val	Pro Ile Arg Leu Asp

95	100	105
Tyr Trp Gly Gln	Gly Thr Leu Val Thr Val	Ser Ser Ala Ser Thr

110	115	120
Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser Thr

125	130	135
Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly Cys	Leu Val Lys Asp Tyr Phe

140	145	150
Pro Glu Pro Val	Thr Val Ser Trp Asn Ser	Gly Ala Leu Thr Ser

155	160	165
Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu Gln	Ser Ser Gly Leu Tyr

170	175	180
Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val Pro	Ser Ser Ser Leu Gly Thr

185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
200	205	210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
320	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
350	355	360
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
365	370	375
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
380	385	390
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
395	400	405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
410	415	420

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