



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010136302/10, 14.01.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.01.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

31.01.2008 US 61/025,137;

29.02.2008 US 61/032,790;

20.05.2008 US 61/054,709;

15.07.2008 US 12/173,465;

15.07.2008 US PCT/US2008/070088

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2012 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 20.06.2015 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO2006034488 A2, 30.03.2006. US 2007/207142 A1, 06.09.2007. POLSON AG et al., "Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma", Blood, 2007;110(2):616-23. RU2221809 C2, 20.01.2004. СЕВЕРИН Е.С. и др., "Биохимия": Учебник.-М.: Медицина, 2006 стр.7

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 31.08.2010

(86) Заявка РСТ:
US 2009/030924 (14.01.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/099728 (13.08.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЧЭНЬ, Ивонне (US),

ДЕННИС, Марк (US),

ДОРНАН, Дэвид (US),

ЭЛКИНС, Кристи (US),

ДЖУНУТУЛА, Джагатх, Редди (US),

ПОЛСОН, Эндрю (US),

ЧЖЭН, Бин (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) АНТИ-CD79b АНТИТЕЛА И ИММУНОКОНЬЮГАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. Предложены варианты гуманизированного анти-CD79b антитела, каждый из которых характеризуется наличием легкой и тяжелой цепи и набором 6 CDR с установленной аминокислотной последовательностью и по

меньшей мере одним свободным цистеиновым аминокислотным остатком, выбранным из A118C (по Европейской нумерации) в тяжелой цепи и V205C (по нумерации Кэбат) в легкой цепи. Рассмотрены: варианты соединения-конъюгата антитела с лекарственным средством, где

антитело связано с лекарственным средством через свободный цистеин; фармацевтический состав для лечения рака на основе антитела; способы детекции CD79b или раковых клеток, а также способ ингибирования клеточной пролиферации, использующие соединение-конъюгат. Описан способ получения соединения-

конъюгата. Данное изобретение может найти дальнейшее применение в терапии раковых заболеваний, ассоциированных с CD79b, в том числе при лечении гемопозитических опухолей у млекопитающих. 8 н. и 62 з.п. ф-лы, 20 табл., 9 пр., 51 ил.

R U 2 5 5 3 5 6 6 C 2

R U 2 5 5 3 5 6 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)*C07K* 19/00 (2006.01)*A61K* 39/395 (2006.01)*A61P* 35/00 (2006.01)*G01N* 33/532 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2010136302/10, 14.01.2009

(24) Effective date for property rights:
14.01.2009

Priority:

(30) Convention priority:

31.01.2008 US 61/025,137;

29.02.2008 US 61/032,790;

20.05.2008 US 61/054,709;

15.07.2008 US 12/173,465;

15.07.2008 US PCT/US2008/070088

(43) Application published: 10.03.2012 Bull. № 7

(45) Date of publication: 20.06.2015 Bull. № 17

(85) Commencement of national phase: 31.08.2010

(86) PCT application:

US 2009/030924 (14.01.2009)

(87) PCT publication:

WO 2009/099728 (13.08.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ChEhN', Ivonne (US),**DENNIS, Mark (US),****DORNAN, Dehvid (US),****EhLKINS, Kristi (US),****DZhUNUTULA, Dzhagatk, Reddi (US),****POLSON, Ehndrju (US),****ChZhEhN, Bin (US)**

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)(54) **ANTI-CD79b ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS FOR USING THEM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention refers to biotechnology. There are presented versions of a humanised anti-CD79b antibody, each of which is characterised by the presence of a light and heavy chain and a set of 6 CDR with a specified amino acid sequence and at least one free cysteine amino acid residue specified in A118C (according to the European Numeration) in the heavy chain and V205C (according to the Kabat numeration) in the light chain. There are disclosed: versions of a conjugate compound of the

antibody and a drug preparation, wherein the antibody is bond to the drug preparation through free cysteine; an antibody-based pharmaceutical compound for treating cancer; method for detecting CD79b or cancer cells, as well as a method for inhibiting cell proliferation using the conjugate compound. What is described is a method for producing the conjugate compound.

EFFECT: invention can find further application in the therapy of CD79b-associated cancer diseases, including treating haemopoietic tumours in mammals.

70 cl, 20 tbl, 9 ex, 51 dwg

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей не являющейся временной заявке, поданной в соответствии со статьей 37, § 1.53(b) Свода Федеральных Правил (CFR), испрашивается приоритет временной заявки на патент США № 61/025137, поданной 31 января 2008 г., предварительной
 5 заявки на патент США рег. № 61/032790, поданной 29 февраля 2008 г., и временной заявки на патент США рег. № 61/054709, поданной 20 мая 2008 г., в соответствии со статьей 35, § 119(e) Кодекса законов США, причем описание каждой из этих заявок полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область, к которой относится изобретение

10 Настоящее изобретение относится к композициям, которые могут быть использованы для лечения гемопоэтической опухоли у млекопитающих, и к способам применения таких композиций.

Предшествующий уровень техники

В США злокачественные опухоли (рак), после болезней сердца, являются вторым
 15 лидирующим заболеванием, приводящим к летальному исходу (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993)). Рак характеризуется увеличением числа патологических или опухолевых клеток, происходящих от нормальной ткани, которая пролиферирует с образованием опухолевой массы и инвазией смежных тканей такими неопластическими опухолевыми клетками, с образованием злокачественных клеток, которые, в конечном
 20 счете, распространяются через систему кровообращения или лимфатическую систему в региональные лимфоузлы и в периферические области по механизму, называемому метастазированием. При раке клетки пролиферируют в условиях, при которых нормальные клетки расти не могут. Само раковое заболевание проявляется в различных формах широкого ряда, характеризующихся различной степенью инвазивности и
 25 агрессивности.

Раковые заболевания, в которых участвуют клетки, образующиеся в процессе гемопоэза, то есть в процессе, благодаря которому образуются клеточные элементы крови, такие как лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты, эритроциты и природные клетки-киллеры, называются раком гемопоэтической системы. Лимфоциты, которые могут
 30 быть обнаружены в крови и в лимфатической ткани и играют решающую роль в иммунном ответе, подразделяются на два основных класса: В-лимфоциты (В-клетки) и Т-лимфоциты (Т-клетки), которые опосредуют гуморальный и клеточно-опосредуемый иммунный ответ, соответственно.

В-клетки созревают в костном мозге и покидают костный мозг, экспрессируя на
 35 своей поверхности антигенсвязывающее антитело. После первого контакта «необученных» В-клеток с антигеном, в отношении которого мембраносвязанное антитело является специфическим, клетки начинают быстро делиться, а их потомство дифференцируется в В-клетки памяти и эффекторные клетки, называемые «плазматическими клетками». В-клетки памяти имеют более продолжительное время
 40 жизни и продолжают экспрессировать мембраносвязанное антитело, которое обладает такой же специфичностью, как и исходные родительские клетки. Плазматические клетки не продуцируют мембраносвязанное антитело, а вместо этого они продуцируют антитело в форме, которая может секретироваться. Секретируемыми антителами являются основные эффекторные молекулы гуморального иммунного ответа.

45 Т-клетки созревают в тимусе и создают условия для пролиферации и дифференцировки незрелых Т-клеток. В процессе своего созревания Т-клетки претерпевают реаранжировку генов, которая приводит к продуцированию Т-клеточного рецептора, и подвергаются позитивному и негативному отбору, который облегчает определение фенотипа

клеточной поверхности зрелых Т-клеток. Характерными маркерами клеточной поверхности зрелых Т-клеток являются комплексы CD3:Т-клеточный рецептор и один из корецепторов, CD4 или CD8.

В попытках выявления эффективных клеточных мишеней для противораковой терапии были проведены исследования по идентификации трансмембранных или других мембраносвязанных полипептидов, которые специфически экспрессируются на поверхности раковых клеток одного или нескольких конкретных типов по сравнению с одной или несколькими нормальными нераковыми клетками. В большинстве случаев такие мембраносвязанные полипептиды в большом количестве экспрессируются на поверхности раковых клеток, но не на поверхности нераковых клеток. Идентификация таких ассоциированных с опухолью полипептидов-антигенов клеточной поверхности дает возможность специфически разрушать раковые клетки-мишени путем терапии с использованием антител. В этой связи следует отметить, что терапия на основе антител оказалась очень эффективной для лечения некоторых раковых опухолей. Так, например, герцептин (HERCEPTIN®) и ритуксан (RITUXAN®) (оба этих антитела поставляются компанией Genentech Inc., South San Francisco, California) представляют собой антитела, которые с успехом применялись для лечения рака молочной железы и неходжкинской лимфомы, соответственно. Более конкретно, HERCEPTIN® представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое было получено методами рекомбинантных ДНК и которое селективно связывается с внеклеточным доменом протоонкогена рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2). Сверхэкспрессия белка HER2 наблюдалась в 25-30% случаев заболеваний первичным раком молочной железы. RITUXAN® представляет собой генетически сконструированное химерное моноклональное антитело «мышь/человек», направленное против антигена CD20, находящегося на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов. Оба эти антитела рекомбинантно продуцируются в клетках СНО.

В других попытках выявления эффективных клеточных мишеней для противораковой терапии были проведены исследования по идентификации (1) полипептидов, которые не являются мембраносвязанными и которые, в отличие от нераковых нормальных клеток одного или нескольких конкретных типов, специфически продуцируются одной или несколькими раковыми клетками конкретных типов, (2) полипептидов, продуцируемых раковыми клетками на уровне экспрессии, значительно превышающем уровень экспрессии полипептидов одной или несколькими нормальными нераковыми клетками, или (3) полипептидов, экспрессия которых, в частности, ограничивается тканями одного типа (или очень ограниченного числа тканей других типов), пораженными и не пораженными раком (например, нормальной тканью предстательной железы и опухолевой тканью предстательной железы). Такие полипептиды могут быть постоянно локализованы внутри клеток, либо они могут секретироваться раковыми клетками. Кроме того, такие полипептиды могут экспрессироваться не самими раковыми клетками, а клетками, которые продуцируют и/или секретируют полипептиды, оказывающие потенцирующее действие на раковые клетки или действие, стимулирующее рост раковых клеток. В большинстве случаев такими секретируемыми полипептидами являются белки, которые обеспечивают раковым клеткам, но не нормальным клеткам, преимущественный рост, и такими полипептидами являются, например, ангиогенные факторы, факторы клеточной адгезии, факторы роста и т.п. При этом предполагается, что идентификация антагонистов указанных полипептидов, которые не являются мембраносвязанными, позволит выявлять эффективные терапевтические средства для лечения указанных раковых заболеваний. Кроме того, идентификация характера

экспрессии таких полипептидов может быть использована для диагностики конкретных раковых опухолей у млекопитающих.

Несмотря на упомянутые выше успехи в противораковой терапии млекопитающих, необходимость в получении дополнительных терапевтических средств, способных детектировать присутствие опухоли у млекопитающих и эффективно ингибировать рост опухолевых клеток, соответственно, остается особенно актуальной. В соответствии с этим, целью настоящего изобретения является идентификация полипептидов, мембраносвязанных, секретируемых или внутриклеточных полипептидов, экспрессия которых, в частности, ограничивается тканями только одного типа (или очень ограниченного числа тканей других типов), гемопоэтическими тканями, пораженными и не пораженными раком; и применение таких полипептидов и нуклеиновых кислот, кодирующих указанные полипептиды, для получения композиций согласно изобретению, которые могут быть использованы в целях терапии и/или диагностики гемопоэтического рака у млекопитающих.

CD79 представляет собой сигнальный компонент В-клеточного рецептора, состоящий из ковалентно связанного гетеродимера, содержащего CD79a (Ig α , mb-1) и CD79b (Ig β , B29). Каждый из CD79a и CD79b содержит внеклеточный домен иммуноглобулина (Ig), трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен и домен активации иммунорецептора, имеющий тирозиновый мотив (ITAM). CD79 экспрессируется на В-клетках и в клетках неходжкинской лимфомы (НХЛ) (Cabezudo et al., *Haematologica*, 84: 413-418 (1999); D'Arena et al., *Am. J. Hematol.*, 64:275-281 (2000); Olejniczak et al., *Immunol. Invest.*, 35:93-114 (2006)). Все CD79a и CD79b и sIg необходимы для поверхностной экспрессии CD79 (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3):270-7). Средний уровень поверхностной экспрессии CD79b на НХЛ аналогичен его экспрессии на нормальных В-клетках, но в более широких пределах (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3): 270-7 (2001)).

Что касается экспрессии CD79b, то можно сказать, что он более эффективен в продуцировании терапевтических антител против антигена CD79b и обладает минимальной антигенностью или вообще не обладает антигенностью при его введении пациентам, а в частности, при продолжительном лечении. Настоящее изобретение удовлетворяет всем этим и другим требованиям. Настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителам, которые не имеют недостатков, присущих современным терапевтическим композициям, а также обладают другими преимуществами, которые будут очевидны из нижеследующего подробного описания.

Использование конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (ADC), то есть иммуноконъюгатов, в целях локальной доставки цитотоксических или цитостатических агентов, например, лекарственных средств, для уничтожения или подавления роста опухолевых клеток при лечении рака (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 & Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz & Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; патент США № 4975278), позволяет осуществлять направленную доставку лекарственного средства в опухоли и обеспечивать их аккумуляцию внутри клеток, тогда как системное введение этих неконъюгированных лекарственных средств может приводить к продуцированию уровней токсичности, которые являются неприемлемыми для нормальных клеток и недостаточными для уничтожения опухолевых клеток (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. (eds.), pp.

475-506). В попытках повысить терапевтический индекс, то есть максимально повысить эффективность и максимально снизить токсичность ADC, все усилия были направлены на повышение селективности поликлональных антител (Rowland et al. (1986), *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87) и моноклональных антител (mAb), а также на улучшение

5 таких свойств, как связывание с лекарственным средством и высвобождение лекарственных средств (Lambert J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549).

Лекарственными средствами, используемыми в конъюгатах «антитело-лекарственное средство», являются бактериальные белковые токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные белковые токсины, такие как рицин, и небольшие молекулы, такие как

10 ауристатин, гелданамицин (Mandler et al., (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92 (19):1573-1581; Mandler et al. (2000), *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al. (2002), *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), калихеамицин (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342), дауномицин, доксорубин, метотрексат

15 и виндезин (Rowland et al. (1986) см. выше). Эти лекарственные средства могут оказывать влияние на цитотоксические и цитостатические механизмы, включая связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства, при их конъюгировании с крупными антителами или лигандами белков-рецепторов, имеют тенденцию к потере или

20 уменьшению активности.

Лекарственные средства, а именно ауристатиновые пептиды, ауристатин E (AE) и монометилауристатин (ММАЕ), т.е. синтетические аналоги доластатина (WO 02/088172), были конъюгированы: (i) с химерными моноклональными антителами cBR96 (специфичными к антигену Lewis Y на карциномах); (ii) с cAC10, которое является

25 специфичным к CD30, присутствующему на гематологических злокачественных опухолях (Klussman et al. (2004) *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773; Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; Francisco et al. (2003) *Blood* 102(4):1458-1465; публикация заявки на патент США 2004/0018194); (iii) с анти-CD20 антителами, такими как ритуксан® (WO 04/032828), используемый для лечения CD20-экспрессирующих раковых

30 опухолей и иммунных расстройств; (iv) с анти-EphB2R антителом 2H9, используемыми для лечения рака прямой и ободочной кишки (Mao et al. (2004) *Cancer Research* 64(3):781-788); (v) с антителом против E-селектина (Bhaskar et al. (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6397); (vi) с трастузумабом (HERCEPTIN®, заявка США 2005/0238649), и (vii) анти-CD30 антителами (WO 03/043583). Варианты ауристатина E описаны в патентах США 5767237

35 и 6124431. Монометилауристатин E, конъюгированный с моноклональными антителами, описан в работе Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, опубликованной 28 марта, 2004. Ауристатиновые аналоги ММАЕ и ММАF были конъюгированы с различными антителами (заявка США 2005/0238649).

40 Стандартный метод присоединения, т.е. ковалентного связывания молекулы лекарственного средства с антителом, по существу позволяет получить гетерогенную смесь молекул, в которых лекарственные средства присоединены в различных участках молекулы антитела. Так, например, цитотоксические лекарственные средства обычно конъюгируют с антителами посредством большого количества лизиновых остатков

45 антитела с получением гетерогенной смеси конъюгата «антитело-лекарственное средство». В зависимости от условий реакции гетерогенная смесь обычно содержит определенное число антител, к которым присоединены от 0 и примерно до 8 или более молекул связанных лекарственных средств. Кроме того, в каждой подгруппе

конъюгатов, с отношением молекул лекарственного средства к молекулам антитела, равным конкретному целому числу, может присутствовать гетерогенная смесь, в которой молекула лекарственного средства присоединена в различных участках антитела.

Аналитические и препаративные методы могут быть неподходящими для разделения и характеристики молекул-конъюгатов “антитело-лекарственное средство” в гетерогенной смеси, полученной в результате реакции конъюгирования. Антитела представляют собой крупные, сложные и отличающиеся по своей структуре биомолекулы, которые, в большинстве случаев, имеют множество реакционноспособных функциональных групп. Способность этих групп реагировать с линкерными реагентами и промежуточными соединениями “лекарственное средство-линкер” зависит от таких факторов, как pH, концентрация, концентрация соли и присутствие соразтворителей. Кроме того, способ многостадийного конъюгирования может оказаться невозможным, что обусловлено трудностями регуляции условий реакции и характеристики реагентов и промежуточных соединений.

В отличие от большинства аминов, которые являются протонированными и менее нуклеофильными при pH~7, тиолы цистеинов являются реакционноспособными при нейтральном pH. Поскольку свободные тиоловые (RSH, сульфгидрильные) группы являются относительно реакционноспособными, то белки, содержащие цистеиновые остатки, часто имеют окисленную форму и представляют собой связанные с дисульфидом олигомеры, либо они содержат внутренние мостиковые дисульфидные группы. Внеклеточные белки обычно не содержат свободных тиоловых групп (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, page 55).

Тиоловые группы цистеина антитела обычно являются более реакционноспособными, то есть более нуклеофильными по отношению к электрофильным реагентам конъюгирования, чем аминокислотные группы или гидроксильные группы антитела. Цистеиновые остатки были введены в белки методами генной инженерии с образованием ковалентных связей с лигандами или с образованием новых внутримолекулярных дисульфидных связей (Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al. (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; патент США 6248564).

Однако конструирование тиоловых групп цистеина путем замены различных аминокислотных остатков белка цистеиновыми остатками может быть связано с определенными проблемами, особенно, если присутствуют несвязанные (свободные Cys) остатки или остатки, которые являются относительно доступными для реакции или окисления. В концентрированных растворах белка, независимо от того, присутствуют ли они в периплазме E. coli, супернатантах культуры или являются частично или полностью очищенными белками, несвязанные остатки Cys на поверхности белка могут связываться и окисляться с образованием межмолекулярных дисульфидов, а следовательно, и димеров или мультимеров белка. Образование дисульфидных димеров сообщает новому остатку Cys неспособность образовывать конъюгаты с лекарственным средством, лигандом или другой меткой. Кроме того, если белок в результате окисления образует внутримолекулярную дисульфидную связь между новым сконструированным Cys и уже имеющимся остатком Cys, то обе тиоловые группы Cys становятся недоступными для функционирования в активном центре и к взаимодействию. Кроме того, такой белок может становиться неактивным или неспецифичным в результате неправильной укладки или потери третичной структуры (Zhang et al. (2002) Anal. Biochem. 311:1-9).

Сконструированные на основе цистеина антитела были получены в виде FАВ-фрагментов антител (тио-Fab) и экспрессированы как полноразмерные моноклональные антитела IgG (тио-Mab) (Junutula, J.R. et al. (2008) J. Immunol Methods 332:41-52; заявка США 2007/0092940, содержание которых вводится в настоящее описание посредством ссылки). Антитела тио-Fab и тио-Mab были конъюгированы посредством линкеров в положениях нововведенных тиолов цистеина с использованием реагирующих с тиолом линкерных реагентов и реагентов «лекарственное средство-линкер» с получением конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (тио-ADC).

Все цитируемые здесь работы, включая патентные заявки и публикации, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителам или к их функциональным фрагментам, а также к способу их применения для лечения гемопоэтических опухолей.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается, предпочтительно специфически, с любым из вышеописанных или нижеописанных полипептидов. Таким антителом является, но необязательно, моноклональное антитело, фрагмент антитела, включая Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагмент, диантитело, однодоменное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое конкурентно ингибирует связывание антитела против полипептида CD79b с его соответствующим антигенным эпитопом. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно, конъюгированы с рост-ингибирующим агентом или с цитотоксическим средством, таким как токсин, включая, например, ауристатин, майтанзиноид, производное доластатина или калихеамицин, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или т.п. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно, продуцированы в клетках СНО или в бактериальных клетках, а предпочтительно индуцируют гибель клеток, с которыми они связываются. Антитела согласно изобретению, используемые в целях детекции, могут быть детектируемо помечены, присоединены к твердому носителю или т.п.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность одновалентного антитела (например, аффинность антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b) или аффинность двухвалентной формы антитела против CD79b (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG-фрагмента против CD79b) по существу аналогична, ниже или выше аффинности одновалентного или аффинности двухвалентного, соответственно, мышинового антитела (например, аффинности мышинового антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента или IgG-фрагмента против CD79b), или химерного антитела (например, аффинности химерного антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента или IgG-фрагмента против CD79b), содержащего последовательность вариабельного домена легкой и тяжелой цепи, или состоящего или по существу состоящего из указанной последовательности, представленной на фигурах 7А-В (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8А-В (SEQ ID NO: 14).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность указанного антитела в его двухвалентной форме по отношению к CD79b (например, аффинность антитела типа IgG против CD79b) составляет 0,4 нМ, 0,2 нМ или 0,5 нМ.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с CD79b, где указанное антитело содержит по меньшей мере одну, две, три,

четыре, пять или шесть HVR, выбранных из группы, состоящей из:

(i) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A15 представляет собой KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) и

(vi) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F10, где F1-F10 представляет собой TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с CD79b, где указанное антитело содержит по меньшей мере один вариант HVR, где указанный вариант HVR содержит модификацию по меньшей мере одного остатка последовательности, представленной в SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 или 136.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-NC, HVR2-NC и/или HVR3-NC, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 164-166).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 156-158).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-NC, HVR2-NC и/или HVR3-NC, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 183-185).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 175-177).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-NC, HVR2-NC и/или HVR3-NC, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 202-204).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 194-196).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-NC, HVR2-NC и/или HVR3-NC, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 221-223).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, включающему вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность

HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 213-215).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителу, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 170, 189, 208 или 227. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителу, содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 169, 188, 207 или 226.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к сконструированному на основе цистеина анти-CD79b антителу, содержащему один или несколько свободных цистеиновых аминокислот и последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 251-298. Сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело может связываться с полипептидом CD79b. Сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело может быть получено способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского анти-CD79b антитела цистеином.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к сконструированному на основе цистеина анти-CD79b антителу, содержащему одну или несколько свободных аминокислот цистеинов, где указанное сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело связывается с полипептидом CD79b, и где указанное антитело было получено способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского анти-CD79b антитела цистеином, где указанное родительское антитело содержит по меньшей мере одну последовательность HVR, выбранную из:

(a) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A15 представляет собой KASQSVDDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) или KASQSVDDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 137);

(b) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой AASNLES (SEQ ID NO: 132);

(c) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133);

(d) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134);

(e) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135), и

(f) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F10, где F1-F10 представляет собой TRRVVYFDY (SEQ ID NO: 136) или TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

Сконструированным на основе цистеина анти-CD79b антителом может быть моноклональное антитело, фрагмент антитела, химерное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое конкурентно ингибирует связывание антитела против полипептида CD79b с его соответствующим антигенным эпитопом. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно, конъюгированы с рост-ингибирующим агентом или с цитотоксическим средством, таким как токсин, включая, например, ауристатин или майтанзиноид. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно, продуцированы в клетках CHO или в бактериальных клетках, а предпочтительно эти антитела ингибируют рост или пролиферацию клеток, с которыми они связываются, или индуцируют гибель этих клеток. Антитела согласно изобретению, используемые в диагностических целях, могут быть детектируемо помечены, присоединены к твердому носителю или т.п.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способам получения антитела согласно изобретению. Так, например, настоящее изобретение относится к способу получения анти-CD79b антитела (которое, как определено в настоящей заявке,

включает полноразмерное антитело и его фрагменты), где указанный способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора согласно изобретению, кодирующего указанное антитело (или его фрагмент), и выделение указанного антитела.

5 В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей антитело согласно изобретению или конъюгат «антитело-лекарственное средство» согласно изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент.

10 В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к промышленному изделию, включающему контейнер, и к композиции, содержащейся в этом контейнере, где указанная композиция включает одно или несколько анти-CD79b антител согласно изобретению.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к набору, включающему первый контейнер, содержащий композицию, содержащую одно или несколько анти-CD79b антител согласно изобретению, и второй контейнер, содержащий буфер.

15 В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению анти-CD79b антитела согласно изобретению в целях получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство.

20 В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению промышленного изделия согласно изобретению в целях получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению набора 25 согласно изобретению в целях получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста клеток, экспрессирующих CD79b, где указанный способ включает контактирование 30 указанной клетки с антителом согласно изобретению и тем самым ингибирование роста указанной клетки. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу 35 терапевтического лечения млекопитающего, имеющего раковую опухоль, содержащую клетки, экспрессирующие CD79b, где указанный способ включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела согласно изобретению и тем самым эффективное лечение указанного млекопитающего. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим 40 средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения клеточно-пролиферативного расстройства, ассоциированного с повышенным уровнем экспрессии CD79b, где указанный способ включает введение 45 индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела согласно изобретению и тем самым эффективное лечение или предупреждение указанного клеточно-пролиферативного расстройства. В одном из вариантов изобретения указанным пролиферативным расстройством является рак. В одном из

вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста клеток, который по меньшей мере частично зависит от рост-потенцирующего действия CD79b, где указанный способ включает контактирование указанной клетки с эффективным количеством антитела согласно изобретению и тем самым ингибирование роста указанных клеток. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу терапевтического лечения опухоли у млекопитающего, рост которой по меньшей мере частично зависит от рост-потенцирующего действия CD79b, где указанный способ включает контактирование указанной клетки с эффективным количеством антитела согласно изобретению и тем самым эффективное лечение указанной опухоли. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей описанный здесь иммуноконъюгат и приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации В-клеток, включающему обработку клеток иммуноконъюгатом, содержащим антитело согласно изобретению, в условиях, благоприятствующих связыванию иммуноконъюгата с CD79b.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу детекции присутствия CD79b в образце, который, как предполагается, содержит CD79b, где указанный способ включает обработку указанного образца антителом согласно изобретению и определение уровня связывания указанного антитела с CD79b в указанном образце, где связывание указанного антитела с CD79b в указанном образце является показателем присутствия указанного белка в данном образце.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу диагностики клеточно-пролиферативного расстройства, ассоциированного с увеличением числа клеток, таких как В-клетки, экспрессирующие CD79b, где указанный способ включает контактирование тестируемых клеток в биологическом образце с любыми из вышеуказанных антител; определение уровня антитела, связанного с тестируемыми клетками в образце, посредством детекции связывания указанного антитела с CD79b; и сравнение уровней антитела, связанного с клетками в контрольном образце, где уровень связанного антитела нормализуют по числу CD79b-экспрессирующих клеток в тестируемых и контрольных образцах, и где более высокий уровень связанного антитела в тестируемом образце, по сравнению с контрольным образцом, указывает на наличие клеточно-пролиферативного расстройства, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD79b.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу детекции растворимого CD79b в крови или сыворотке, где указанный способ включает контактирование указанной тестируемой пробы крови или сыворотки, взятой у млекопитающего, у которого подозревается В-клеточно-пролиферативное расстройство, с анти-CD79b антителом согласно изобретению, и детекция увеличения уровня

растворимого CD79b в тестируемой пробе крови по сравнению с его уровнем в контрольной пробе крови или сыворотки, взятой у здорового млекопитающего.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу связывания антитела согласно изобретению с клеткой, экспрессирующей CD79b, где указанный способ включает контактирование указанной клетки с указанным антителом согласно изобретению. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

Краткое описание графического материала

На фигуре 1 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1) кДНК PRO36249, где SEQ ID NO: 1 представляет собой клон, обозначенный "DNA225786" (также называемый здесь "CD79b"). Нуклеотидная последовательность кодирует CD79b со старт- и стоп-кодонами, которые выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фигуре 2 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2), происходящая от кодирующей последовательности SEQ ID NO: 1, представленной на фигуре 1.

На фигуре 3 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 3) легкой цепи химерного мышинового анти-CD79b антитела (chMA79b) IgG1 (MA79b представляет собой мышинное моноклональное анти-CD79b антитело). Нуклеотидная последовательность кодирует легкую цепь chMA79b со старт- и стоп-кодонами, которые выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фигуре 4 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4), не содержащая первых 18 аминокислот сигнальной последовательности и происходящая от кодирующей последовательности SEQ ID NO: 3, представленной на фигуре 3.

Вариабельные области не подчеркнуты.

На фигуре 5 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 5) тяжелой цепи химерного мышинового антитела (chMA79b) IgG1 (MA79b представляет собой мышинное моноклональное анти-CD79b антитело). Нуклеотидная последовательность кодирует тяжелую цепь chMA79b со старт- и стоп-кодонами, которые выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фигуре 6 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 6), не содержащая первых 18 аминокислот сигнальной последовательности и последнего лизина (K) перед стоп-кодоном и происходящая от кодирующей последовательности SEQ ID NO: 5, представленной на фигуре 5. Вариабельные области не подчеркнуты.

На фигурах 7А-В показано выравнивание последовательностей вариабельных легких цепей: консенсусной последовательности человеческой легкой цепи каппа I (обозначенной "huKI"; SEQ ID NO: 9) с VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3, VL-FR4 (SEQ ID NO: 139-142, соответственно), мышинового анти-CD79b антитела (обозначенного "MA79b"; SEQ ID NO: 10), MA79b-связанного «гуманизированного» антитела (обозначенного «huMA79b-гибрид»; SEQ ID NO: 11), MA79b-связанного варианта 17 «гуманизированного» антитела (обозначенного "huMA79b.v17"; SEQ ID NO: 169), MA79b-связанного варианта 18 «гуманизированного» антитела (обозначенного "huMA79b.v18"; SEQ ID NO: 188), MA79b-связанного варианта 28 «гуманизированного» антитела (обозначенного "huMA79b.v28"; SEQ ID NO: 207) и MA79b-связанного варианта 32 «гуманизированного» антитела (обозначенного "huMA79b.v32"; SEQ ID NO: 226). Положения пронумерованы по Кэбату, а гипервариабельные области (HVR) от MA79b, присоединенные к консенсусной каркасной области вариабельной области легкой цепи каппа I, указаны в рамках.

На фигурах 8А-В проиллюстрировано выравнивание последовательностей
 5 варьируемых областей тяжелых цепей: консенсусной последовательности человеческой
 тяжелой цепи подгруппы III (обозначенной “humIII”; SEQ ID NO: 13) с VH-FR1, VH-FR2,
 VH-FR3 и VH-FR4 (SEQ ID NO: 143-146), мышиногo анти-CD79b антитела (обозначенного
 “MA79b”; SEQ ID NO: 14), MA79b-связанного «гуманизированного» антитела
 (обозначенного “huMA79b-гибрид”; SEQ ID NO: 15) (содержащего 71А, 73Т и 78А),
 MA79b-связанного варианта 17 «гуманизированного» антитела (обозначенного
 “huMA79b.v17”; SEQ ID NO: 170) (содержащего 71А, 73Т и 78А), MA79b-связанного
 10 варианта 18 «гуманизированного» антитела (обозначенного “huMA79b.v18”; SEQ ID
 NO: 189) (содержащего 71А, 73Т и 78А), MA79b-связанного варианта 28
 «гуманизированного» антитела (обозначенного “huMA79b.v28”; SEQ ID NO: 208)
 (содержащего 71А, 73Т и 78А) и MA79b-связанного варианта 32 «гуманизированного»
 антитела (обозначенного “huMA79b.v32”; SEQ ID NO: 227) (содержащего 71А, 73Т и
 78А). Положения пронумерованы по Кэбату, а гиперварируемые области (HVR) от
 15 MA79b, присоединенные к консенсусной каркасной области варьируемой области
 тяжелой цепи подгруппы III, указаны в рамках.

На фигуре 9 представлены различные последовательности HVR выбранных вариантов
 MA79b-связанного «гуманизированного» антитела (SEQ ID NO: 17-21), где каждый
 вариант имеет одну аминокислотную замену в одной HVR MA79b-связанного
 20 «гуманизированного» антитела (HVR-L1 (SEQ ID NO: 131); HVR-L2 (SEQ ID NO: 132);
 HVR-L3 (SEQ ID NO: 133)). Последовательности варьируемой области легкой цепи и
 варьируемой области тяжелой цепи, находящиеся за пределами указанной одной
 аминокислотной замены, идентичны huMA79b-гибриду и на фигуре не показаны. Каких-
 либо изменений в HVR-H1 (SEQ ID NO: 134), HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) или HVR-H3
 25 (SEQ ID NO: 136) MA79b-связанного «гуманизированного» антитела не наблюдалось.

На фигуре 10 представлены различные последовательности HVR выбранных
 вариантов MA79b-связанного «гуманизированного» антитела (SEQ ID NO: 22-106),
 включая huMA79b L2-2 (также обозначенное здесь “L2”) и huMA79b H3-10 (также
 обозначенное здесь “H3”), где каждый вариант имеет множество аминокислотных замен
 30 в одной области HVR MA79b-связанного «гуманизированного» антитела (HVR-L2 (SEQ
 ID NO: 132); HVR-L3 (SEQ ID NO: 133); HVR-H1 (SEQ ID NO: 134); часть HVR-H3 (SEQ
 ID NO: 136) показана на фигуре 10 как SEQ ID NO: 107). Последовательности
 варьируемой области легкой цепи и варьируемой области тяжелой цепи, находящиеся
 за пределами указанных аминокислотных замен, идентичны последовательности
 35 huMA79b-гибрида и на фигуре не показаны. Каких-либо изменений в HVR-L1 (SEQ ID
 NO: 131) или HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) MA79b-связанного «гуманизированного»
 антитела не наблюдалось.

На фигуре 11 проиллюстрирован Biacore-анализ выбранных анти-CD79b антител,
 включая мышиногo анти-CD79b антитело (обозначенное “MA79b”), MA79b-связанное
 40 «гуманизированное» антитело (обозначенное «huMA79b-гибрид») и варианты MA79b-
 связанного «гуманизированного» антитела, включая huMA79b L2-2 (52R, 53K, 55G,
 56R; SEQ ID NO: 22), huMA79b H3-10 (98I, 99R, 100L; SEQ ID NO: 94), huMA79b H1-6
 (28P, 30T, 31R, 35N; SEQ ID NO: 57) и huMA79b L2/H3 (мутации L2-2 и H3-10, описанные
 ниже) против указанных антигенов, включая внеклеточный домен человеческого CD79b
 45 (huCD79b_{ecd}), внеклеточный домен человеческого CD79b, присоединенный к Fc
 (huCD79b_{ecd}-Fc) и пептид из 16 аминокислот, содержащий эпитоп для MA79b и chMA79b
 (SEQ ID NO: 16).

На фигуре 12 проиллюстрирован Biacore-анализ выбранных анти-CD79b антител,

включая МА79b-связанное «гуманизированное» антитело (обозначенное “huMA79b-гибрид”) и варианты МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (обозначенные как 1-34 в первом столбце или как «вся каркасная область» в первом столбце) против внеклеточного домена человеческого CD79b (антигена huCD79b-ecd). Варианты МА79b-связанного «гуманизированного» антитела включают варианты «всех каркасных областей», в которых присутствуют потенциально важные мышинные каркасные остатки, и варианты (обозначенные 1-34) с комбинациями мутаций в каркасной области в присутствии или в отсутствии мутаций HVR варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи. Вариант 17 МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (обозначенный здесь “huMA79b.v17”) указан в первом столбце как 17, вариант 18 МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (обозначенный здесь “huMA79b.v18”) указан в первом столбце как 18, вариант 28 МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (обозначенный здесь “huMA79b.v28”) указан в первом столбце как 28, а вариант 32 МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (обозначенный здесь “huMA79b.v32”) указан в первом столбце как 32. Укладка, характерная для двухвалентного связывания, представлена как Kd конкретного варианта МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (обозначенная “Kd_{variant}”)/Kd химерного антитела МА79b (chMA79b) (обозначенного “Kd_{chimera}”); величины под столбцом, озаглавленном «укладка, характерная для двухвалентного связывания», представляют Kd_{variant}/Kd_{chimera}. Недетектируемое связывание обозначено на фигуре как “NDB”.

На фигурах 13А-В (консенсусные каркасные варибельные области тяжелой цепи (VH)) и на фигуре 14 (консенсусные каркасные варибельные области легкой цепи (VL)) указаны репрезентативные консенсусные каркасные акцепторные последовательности человеческого антитела, используемые для осуществления настоящего изобретения, вместе с последовательностями-идентификаторами, такими как: (фигуры 13А-В) консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы I без CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 108), консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы I без удлинённых гиперварибельных областей (SEQ ID NO: 109-111), консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы II без CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 112), консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы II без удлинённых гиперварибельных областей (SEQ ID NO: 113-115), консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы III без CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 116), консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы III без удлинённых гиперварибельных областей (SEQ ID NO: 117-119), акцепторная каркасная область человеческой VH без CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 120), акцепторная каркасная область человеческой VH без удлинённых гиперварибельных областей (SEQ ID NO: 121-122), акцепторная каркасная область человеческой VH 2 без CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 123) и акцепторная каркасная область человеческой VH 2 без удлинённых гиперварибельных областей (SEQ ID NO: 124-26) и (фигура 14) консенсусная каркасная область человеческой VL каппа подгруппы I (SEQ ID NO: 127), консенсусная каркасная область человеческой VL каппа подгруппы II (SEQ ID NO: 128), консенсусная человеческая каркасная область каппа подгруппы III (SEQ ID NO: 129) и консенсусная человеческая каркасная область каппа подгруппы IV (SEQ ID NO: 130).

На фигурах 15А (легкая цепь) и 15В (тяжелая цепь) представлены аминокислотные последовательности антитела согласно изобретению (huMA79b.v17). На фигуре 15А (легкая цепь) и 15В (тяжелая цепь) показаны аминокислотные последовательности

каркасной области (FR), гипервариабельной области (HVR), первого константного домена (CL или CH1) и Fc-области (Fc) одного из вариантов антитела согласно изобретению (huMA79b.v17) (SEQ ID NO: 152-159 (фигура 15A) и SEQ ID NO: 160-168 (фигура 15B)). Также представлены полноразмерные аминокислотные последовательности (вариабельные и константные области) легкой и тяжелой цепей huMA79b.v17 (SEQ ID NO: 303 (фигура 15A) и 304 (фигура 15B), соответственно, с подчеркнутыми константными доменами. Представлены аминокислотные последовательности вариабельных доменов (SEQ ID NO: 169 (фигура 15A для легкой цепи) и SEQ ID NO: 170 (фигура 15B для тяжелой цепи)).

На фигурах 16A (легкая цепь) и 16B (тяжелая цепь) представлены аминокислотные последовательности антитела согласно изобретению (huMA79b.v18). На фигуре 16A (легкая цепь) и 16B (тяжелая цепь) показаны аминокислотные последовательности каркасной области (FR), гипервариабельной области (HVR), первого константного домена (CL или CH1) и Fc-области (Fc) одного из вариантов антитела согласно изобретению (huMA79b.v18) (SEQ ID NO: 171-178 (фигура 16A) и SEQ ID NO: 179-187 (фигура 16B)). Также представлены полноразмерные аминокислотные последовательности (вариабельные и константные области) легкой и тяжелой цепей huMA79b.v18 (SEQ ID NO: 305 (фигура 16A) и 306 (фигура 16B), соответственно, с подчеркнутыми константными доменами. Представлены аминокислотные последовательности вариабельных доменов (SEQ ID NO: 188 (фигура 16A для легкой цепи) и SEQ ID NO: 189 (фигура 16B для тяжелой цепи)).

На фигурах 17A (легкая цепь) и 17B (тяжелая цепь) представлены аминокислотные последовательности антитела согласно изобретению (huMA79b.v28). На фигуре 17A (легкая цепь) и 17B (тяжелая цепь) показаны аминокислотные последовательности каркасной области (FR), гипервариабельной области (HVR), первого константного домена (CL или CH1) и Fc-области (Fc) одного из вариантов антитела согласно изобретению (huMA79b.v28) (SEQ ID NO: 190-197 (фигура 17A) и SEQ ID NO: 198-206 (фигура 17B)). Также представлены полноразмерные аминокислотные последовательности (вариабельные и константные области) легкой и тяжелой цепей huMA79b.v28 (SEQ ID NO: 307 (фигура 17A) и 308 (фигура 17B), соответственно, с подчеркнутыми константными доменами. Представлены аминокислотные последовательности вариабельных доменов (SEQ ID NO: 207 (фигуры 7A-B для легкой цепи) и SEQ ID NO: 208 (фигуры 8A-B для тяжелой цепи)).

На фигуре 18A (легкая цепь) и 18B (тяжелая цепь) представлены аминокислотные последовательности антитела согласно изобретению (huMA79b.v32). На фигуре 18A (легкая цепь) и 18B (тяжелая цепь) показаны аминокислотные последовательности каркасной области (FR), гипервариабельной области (HVR), первого константного домена (CL или CH1) и Fc-области (Fc) одного из вариантов антитела согласно изобретению (huMA79b.v32) (SEQ ID NO: 209-216 (фигура 18A) и SEQ ID NO: 217-225 (фигура 18B)). Также представлены полноразмерные аминокислотные последовательности (вариабельные и константные области) легкой и тяжелой цепей huMA79b.v32 (SEQ ID NO: 309 (фигура 18A) и 310 (фигура 18B), соответственно, с подчеркнутыми константными доменами. Представлены аминокислотные последовательности вариабельных доменов (SEQ ID NO: 226 (фигура 18A для легкой цепи) и SEQ ID NO: 227 (фигура 18B для тяжелой цепи)).

На фигуре 19 проиллюстрировано выравнивание аминокислотных последовательностей CD79b человека (SEQ ID NO: 2), собакоподобных обезьян (супо) (SEQ ID NO: 7) и мышей (SEQ ID NO: 8). Аминокислотные последовательности CD79b

человека и собакоподобных обезьян идентичны на 85%. Также показаны сигнальная последовательность, тестируемый пептид (эпитоп из 11 аминокислот для MA79b, chMA79b и антитела против CD79b собакоподобных обезьян, описанные в примере 1; ARSEDRYRNPK (SEQ ID NO: 12)), трансмембранный (TM) домен и домен мотива активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Область, показанная в рамке, представляет собой область CD79b, которая отсутствует в сплайсированном варианте CD79b (как описано в примере 1).

На фигуре 20 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* в BJAB-люциферазной модели ксенотрансплантата, где из указанного графика видно, что введение анти-CD79b антител ((a) chMA79b-SMCC-DM1, загрузка лекарственного средства составляет приблизительно 2,9 (таблица 9) и (b) huMA79b L2/H3-SMCC-DM1, загрузка лекарственного средства составляет приблизительно 2,4 (таблица 9)) мышам SCID, имеющим человеческую В-клеточную опухоль, приводит к значительному ингибированию роста опухоли. Контроль включает Herceptin® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (анти-HER2-SMCC-DM1).

На фигуре 21A представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата Granta-519 (человеческой лимфомы клеток коры головного мозга), где из указанного графика видно, что введение анти-CD79b антител ((a) chMA79b-SMCC-DM1, загрузка лекарственного средства составляет приблизительно 3,6 (таблица 10), (b) huMA79b.v17-SMCC-DM1, загрузка лекарственного средства составляет приблизительно 3,4 (таблица 10), (c) huMA79b.v28-SMCC-DM1, загрузка лекарственного средства составляет приблизительно 3,3 или 3,4 (таблица 10), (d) huMA79b.v18-SMCC-DM1, загрузка лекарственного средства составляет приблизительно 3,4 (таблица 10) и (e) huMA79b.v32-SMCC-DM1, загрузка лекарственного средства составляет приблизительно 2,9 (таблица 10)) мышам SCID, имеющим человеческую В-клеточную опухоль, приводит к значительному ингибированию роста опухоли. Контроль включает Herceptin® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (анти-HER2-SMCC-DM1). На фигуре 21B представлен график изменения процента по массе у исследуемых мышей с ксенотрансплантатом Granta-519 (фигура 21A и таблица 10), указывающий на отсутствие каких-либо значимых изменений массы в течение первых 7 дней проведения исследований. «hu» означает гуманизированное антитело, а «ch» означает химерное антитело.

На фигуре 22 представлены конъюгаты «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» (ADC), где молекула лекарственного средства присоединена к сконструированной цистеиновой группе: в легкой цепи (LC-ADC); тяжелой цепи (HC-ADC); и в Fc-области (Fc-ADC).

На фигуре 23 проиллюстрированы стадии: (i) восстановления аддуктов цистеиновых дисульфидов и межцепевых и внутрицепевых дисульфидов в анти-CD79b антителе, сконструированном на основе цистеина (ThioMab), восстановителем TCEP (гидрохлоридом трис-(2-карбоксиэтил)фосфина); (ii) частичного окисления, то есть повторного окисления с образованием межцепевых и внутрицепевых дисульфидов под действием dhAA (дегидроаскорбиновой кислоты); и (iii) конъюгирования повторно окисленного антитела с промежуточным соединением «лекарственное средство-линкер» с образованием конъюгата «цистеиновое анти-CD79b антитело-лекарственное средство» (ADC).

На фигуре 24 показаны (A) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 229) и (B) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 228) гуманизированного анти-CD79b антитела, сконструированного на основе цистеина (тио-huMA79b.v17-HC-A118C), где

аланин, присутствующий в положении 118 в соответствии с Европейской системой нумерации (положение аланина 118 в соответствии с последовательной системой нумерации; положение по Кэбату - 114), в тяжелой цепи был заменен на цистеин.

Молекула лекарственного средства может быть присоединена к введенной цистеиновой группе в тяжелой цепи. На каждой фигуре модифицированная аминокислота показана жирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Константные области подчеркнуты одной чертой. Вариабельные области не подчеркнуты. Fc-область показана курсивом. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 25 показаны (А) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 231) и (В) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 230) гуманизированного анти-CD79b антитела, сконструированного на основе цистеина (тео-huMA79b.v18-НС-A118C), где аланин, присутствующий в положении 118 в соответствии с Европейской системой нумерации (положение аланина 118 в соответствии с последовательной системой нумерации; положение по Кэбату - 114), в тяжелой цепи был заменен на цистеин.

Молекула лекарственного средства может быть присоединена к введенной цистеиновой группе в тяжелой цепи. На каждой фигуре модифицированная аминокислота показана жирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Константные области подчеркнуты одной чертой. Вариабельные области не подчеркнуты. Fc-область показана курсивом. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 26 показаны (А) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 233) и (В) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 232) гуманизированного анти-CD79b антитела, сконструированного на основе цистеина (тео-huMA79b.v28-НС-A118C), где аланин, присутствующий в положении 118 в соответствии с Европейской системой нумерации (положение аланина 118 в соответствии с последовательной системой нумерации; положение по Кэбату - 114), в тяжелой цепи был заменен на цистеин.

Молекула лекарственного средства может быть присоединена к введенной цистеиновой группе в тяжелой цепи. На каждой фигуре модифицированная аминокислота показана жирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Константные области подчеркнуты одной чертой. Вариабельные области не подчеркнуты. Fc-область показана курсивом. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 27 показаны (А) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 235) и (В) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 234) анти-CD79b антитела, сконструированного на основе цистеина (тео-huMA79b-LC-V205C), где валин в положении 205 по Кэбату (положение валина 209 в соответствии с последовательной системой нумерации) легкой цепи был заменен на цистеин. Молекула лекарственного средства может быть присоединена к введенной цистеиновой группе в легкой цепи. На каждой фигуре модифицированная аминокислота показана жирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Константные области подчеркнуты одной чертой. Вариабельные области не подчеркнуты. Fc-область показана курсивом. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело.

На фигуре 28 показаны (А) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 237) и (В) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 236) анти-CD79b антитела, сконструированного на основе цистеина (тео-huMA79b-НС-A118C), где аланин, присутствующий в положении 118 в соответствии с Европейской системой нумерации (положение аланина 118 в соответствии с последовательной системой нумерации;

положение по Кэбату - 114), в тяжелой цепи был заменен на цистеин. Молекула лекарственного средства может быть присоединена к введенной цистеиновой группе в тяжелой цепи. На каждой фигуре модифицированная аминокислота показана жирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Константные области подчеркнуты одной чертой.

5 Вариабельные области не подчеркнуты. Fc-область показана курсивом. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело.

На фигурах 29А-В представлены FACS-графики, указывающие на то, что связывание конъюгатов «анти-CD79b антитело thioMAb-лекарственное средство» (TDC) согласно изобретению с CD79b, экспрессируемым на поверхности клеток ВJAB, содержащих

10 люциферазу, аналогично связыванию конъюгированных (А) вариантов LC(V205C) тео-MAb и (В) вариантов HC(A118C) тео-MAb антитела chMA79b с MMAF. Детекцию проводили с помощью масс-спектрометрии (МС) с использованием ФЭ-конъюгированного антитела против человеческого IgG. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело.

15 На фигурах 30А-Д представлены FACS-графики, указывающие на то, что связывание конъюгатов «анти-CD79b антитело thioMAb-лекарственное средство» (TDC) согласно изобретению с CD79b, экспрессируемым на поверхности клеток ВJAB, содержащих люциферазу, аналогично связыванию (А) «оголенных» (неконъюгированных) вариантов HC(A118C) тео-MAb huMA79b.v18 и конъюгированных вариантов HC(A118C) тео-MAb

20 антитела huMA79b.v18 с различными указанными конъюгатами лекарственных средств ((В) MMAF, (С) MMAE и (D) DM1)). Детекцию проводили с помощью масс-спектрометрии (МС) с использованием ФЭ-конъюгированного антитела против человеческого IgG. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

25 На фигурах 31А-Д представлены FACS-графики, указывающие на то, что связывание конъюгатов «анти-CD79b антитело thioMAb-лекарственное средство» (TDC) согласно изобретению с CD79b, экспрессируемым на поверхности клеток ВJAB, содержащих люциферазу, аналогично связыванию (А) «оголенных» (неконъюгированных) вариантов HC(A118C) тео-MAb huMA79b.v28 и конъюгированных вариантов HC(A118C) тео-MAb

30 антитела huMA79b.v28 с различными указанными конъюгатами лекарственных средств ((В) MMAE, (С) DM1 и (D) MMAF)). Детекцию проводили с помощью масс-спектрометрии (МС) с использованием ФЭ-конъюгированного антитела против человеческого IgG. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

35 На фигурах 32А-Д представлены FACS-графики, указывающие на то, что связывание конъюгатов «антитело против CD79b собакоподобных обезьян тео-MAb-лекарственное средство» (TDC) согласно изобретению с CD79b, экспрессируемым на поверхности ВJAB-клеток, экспрессирующих CD79b собакоподобных обезьян, аналогично связыванию (А) «оголенных» (неконъюгированных) вариантов HC(A118C) тео-MAb

40 против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10) и конъюгированных вариантов HC(A118C) тео-MAb против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10) с различными указанными конъюгатами лекарственных средств ((В) MMAE, (С) DM1 и (D) MMAF)). Детекцию проводили с помощью масс-спектрометрии (МС) с использованием ФЭ-конъюгированного антитела против человеческого IgG. «Тео» означает

45 сконструированное на основе цистеина антитело.

На фигуре 33А представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у моделей ксенотрансплантата Granta-519 (человеческой лимфомы клеток коры головного мозга), на котором видно, что введение анти-CD79b TDC, которые отличаются в положениях

введенного цистеина (LC (V205C) или HC (A118C)) и/или различными дозами лекарственного средства, мышам SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводит к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата, обработанные тио-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF с загрузкой лекарственного средства

5 приблизительно 1,9 (таблица 11) или тио-chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,8 (таблица 11), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали hu-анти-HER2-MC-MMAF и тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF и chMA79b-MC-MMAF. На фигуре 33В представлен график изменения процента по массе у исследуемых

10 мышей с ксенотрансплантатом Granta-519 (фигура 33А и таблица 11), указывающий на отсутствие каких-либо значимых изменений массы в течение первых 14 дней проведения исследований. «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 34А представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели

15 ксенотрансплантата клеток BJAB, содержащих люцифразу (лимфомы Беркитта), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 или MC-MMAF), мышам SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата, обработанные тио-

20 huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,87 (таблица 12), тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 12), или тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,95 (таблица 12), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования.

25 В качестве контроля использовали контрольное анти-HER2 антитело (тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), контрольное антитело huMA79b.v28 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 и тио-huMA79b.v28-HC(A118C)) и контрольное анти-CD22 антитело (тио-hu-анти-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). На фигуре 34В представлен график

30 изменения процента массы исследуемых мышей с ксенотрансплантатом BJAB-люциферазы (фигура 34А и таблица 12), указывающий на отсутствие каких-либо значимых изменений массы в течение первых 7 дней проведения исследований. «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 35А представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата WSU-DLCL2 (диффузной крупноклеточной лимфомы), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 или MC-MMAF), мышам

40 SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата, обработанные тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,87 (таблица 13), тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 13), или тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,95 (таблица

45 13), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали контрольное анти-HER2 антитело (тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), контрольное антитело huMA79b.v28 (huMA79b.v28-

SMCC-DM1 и тио-huMA79b.v28-НС(A118C)) и контрольное анти-CD22 антитело (тио-hu-анти-CD22(10F4v3)-НС(A118C)-МС-MMAF). На фигуре 35В представлен график изменения процента массы исследуемых мышей с ксенотрансплантатом WSU-DLCL2 (фигура 35А и таблица 13), указывающий на отсутствие каких-либо значимых изменений массы в течение первых 7 дней проведения исследований. «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 36 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата DONH2 (фолликулярной лимфомы), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (BMPEO-DM1, МС-MMAF или МСvcPAB-MMAE), мышам SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата, обработанные тио-huMA79b.v28-BMPEO-DM1 (с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 14)), тио-huMA79b.v28-МС-MMAF (с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,95 (таблица 14)) или тио-МА796-НС(A118C)-МСvcPAB-MMAE (с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,87 (таблица 14)), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали контрольное анти-HER2 антитело (тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-МС-MMAF, тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-МСvcPAB-MMAE), контрольное антитело huMA79b.v28 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 и тио-huMA79b.v28-НС(A118C)) и контрольное анти-CD22 антитело (тио-hu-анти-CD22(10F4v3)-НС(A118C)-МС-MMAF). «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 37 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата клеток VJAB, содержащих люцифразу, (лимфомы Беркитта), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (МСvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 или МС-MMAF), и/или в различных дозах мышам SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата, обработанные тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 15), тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-МСvcPAB-MMAE, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,9 (таблица 15), или тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-МС-MMAF, с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,9 (таблица 15), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали носитель (только буфер), контрольное анти-HER2 антитело (тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-МС-MMAF, тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-МСvcPAB-MMAE), контрольное антитело huMA79b.v28 (тио-huMA79b.v28-НС(A118C)) и контрольное анти-CD22 антитело (тио-hu-анти-CD22(10F4v3)-НС(A118C)-МС-MMAF). «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 38А представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата Granta-519 (человеческой лимфомы клеток коры головного мозга), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (BMPEO-DM1 или МС-MMAF) и/или в различных дозах мышам SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата,

обработанные тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 16) или тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-MC-MMAF с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,95 (таблица 16), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали контрольное анти-HER2 антитело (тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MC-MMAF). На фигуре 38B представлен график изменения процента массы исследуемых мышей с ксенотрансплантатом Granta-519 (фигура 38A и таблица 16), указывающий на отсутствие каких-либо значимых изменений массы в течение первых 14 дней проведения исследований. «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 39 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата WSU-DLCL2 (диффузной крупноклеточной лимфомы), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (BMPEO-DM1, MC-MMAF или MCvcPAB-MMAE) и/или в различных дозах мышам SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата, обработанные тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 17), тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-MC-MMAF с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,9 (таблица 17) или тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,9 (таблица 17), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали носитель (только буфер) и контрольное анти-HER2 антитело (тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MC-MMAF, тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 40 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата Granta-519 (человеческой лимфомы клеток коры головного мозга), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (BMPEO-DM1 или MCvcPAB-MMAE) и/или в различных дозах мышам SCID, имеющим человеческие В-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата, обработанные тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 18) или тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,87 (таблица 18), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали контрольное анти-HER2 антитело (тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). «Тио» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 41 представлен график, построенный по результатам анализа на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* (A) BJAB, (B) Granta-519 или (C) WSU-DLCL2, обработанных различными концентрациями 0,001-10000 нг TDC на мл, включая: (1) контрольное антитело тио-hu-анти-gD-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, с загрузкой 2,0 MMAE/Ab, (2) контрольное антитело тио-hu-анти-gD-NC(A118C)-MC-MMAF, с загрузкой 2,1 MMAF/Ab, (3) контрольное антитело тио-hu-анти-gD-NC(A118C)-BMPEO-DM1, с загрузкой 2,1 DM1/Ab, (4) тио-huMA79b.v18-NC(A118C)-MC-MMAF, с загрузкой 1,91

ММАF/Ab, (5) тию-huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1, с загрузкой 1,8 DM1/Ab, и (6) тию-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-ММАЕ, с загрузкой 2,0 ММАЕ/Ab. “Тию” означает сконструированное на основе цистеина антитела, а “hu” означает гуманизированное антитело. “gD” означает гликопротеин D.

5 На фигуре 42 представлена нуклеотидная последовательность кДНК (SEQ ID NO: 238) PRO283627, где SEQ ID NO: 235 представляет собой клон, обозначенный “DNA548455” (также называемый здесь “супо CD79b”). Нуклеотидная последовательность кодирует CD79b собакоподобных обезьян со старт- и стоп-кодонами, которые указаны жирным шрифтом и подчеркнуты.

10 На фигуре 43 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 239), происходящая от кодирующей последовательности SEQ ID NO: 235, представленной на фигуре 42.

На фигуре 44 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 240) легкой цепи антитела против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10). Нуклеотидная последовательность кодирует легкую цепь антитела против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10) со старт- и стоп-кодонами, которые указаны жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фигуре 45 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 241), не содержащая первых 18 аминокислот сигнальной последовательности и происходящая от кодирующей последовательности SEQ ID NO: 240, представленной на фигуре 44. Варибельные области (SEQ ID NO: 302) не подчеркнуты.

На фигуре 46 представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 242) тяжелой цепи антитела против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10). Нуклеотидная последовательность кодирует тяжелую цепь антитела против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10) со старт- и стоп-кодонами, которые указаны жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фигуре 47 представлена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 243), не содержащая первых 18 аминокислот сигнальной последовательности и последнего лизина (K) перед стоп-кодом и происходящая от кодирующей последовательности SEQ ID NO: 242, представленной на фигуре 46. Варибельные области (SEQ ID NO: 301) не подчеркнуты.

На фигуре 48 показаны (A) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 245) и (B) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 244) антитела против CD79b собакоподобных обезьян, сконструированного на основе цистеина (тио-анти-супоCD79b-НС-A118C), где аланин, присутствующий в положении 118 в соответствии с Европейской системой нумерации (положение аланина 118 в соответствии с последовательной системой нумерации; положение по Кэбату - 114), в тяжелой цепи был заменен на цистеин. Аминокислота D в положении 6 в соответствии с Европейской системой нумерации (на фигуре заштрихована) в тяжелой цепи может альтернативно представлять собой E. Молекула лекарственного средства может быть присоединена к введенной цистеиновой группе в тяжелой цепи. На каждой фигуре модифицированная аминокислота показана жирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Константные области подчеркнуты одной чертой. Варибельные области не подчеркнуты. Fc-область показана курсивом. «Тию» означает сконструированное на основе цистеина антитело.

45 На фигуре 49 показаны (A) последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 300) и (B) последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 299) антитела против CD79b собакоподобных обезьян, сконструированного на основе цистеина (тио-анти-супоCD79b-LC-V205C), где валин в положении 205 по Кэбату (положение валина 209 дано в

соответствии с последовательной системой нумерации) в легкой цепи был заменен на цистеин. Аминокислота D в положении 6 в соответствии с Европейской системой нумерации (на фигуре заштрихована) в тяжелой цепи может альтернативно представлять собой E. Молекула лекарственного средства может быть присоединена к введенной цистеиновой группе тяжелой цепи. На каждой фигуре модифицированная аминокислота показана жирным шрифтом с двойным подчеркиванием. Константные области подчеркнуты одной чертой. Вариабельные области не подчеркнуты. Fc-область показана курсивом. «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело.

На фигуре 50 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата BJAB-супоCD79b (клетки BJAB, экспрессирующие супоCD79b) (лимфомы Беркитта), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «линкер-лекарственное средство» (BMPEO-DM1, MC-MMAF или MCvcPAB-MMAE), мышам SCID, имеющим человеческие B-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели

ксенотрансплантата, обработанные тео-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 19), тео-huMA79b.v28-NC(A118C)-MC-MMAF с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,9 (таблица 19), или тео-huMA79b.v28-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,9 (таблица 19), тео-анти-супо-CD79b (ch10D10)-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,8 (таблица 19), тео-анти-супо-CD79b (ch10D10)-NC(A118C)-MC-MMAF с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,9 (таблица 19) или тео-анти-супо-CD79b (ch10D10)-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,86 (таблица 19), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования.

В качестве контроля использовали контрольное анти-HER2 антитело (тео-hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тео-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, тео-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MC-MMAF). «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

На фигуре 51 представлен график ингибирования роста опухоли *in vivo* у модели ксенотрансплантата BJAB-супоCD79b (клетки BJAB, экспрессирующие супоCD79b) (лимфомы Беркитта), где показано, что введение анти-CD79b TDC, конъюгированных с различными молекулами «BMPEO-DM1-линкер-лекарственное средство», в различных дозах мышам SCID, имеющим человеческие B-клеточные опухоли, приводило к значительному ингибированию роста опухоли. Модели ксенотрансплантата,

обработанные тео-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,85 (таблица 20) или тео-анти-супо(ch10D10)-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства приблизительно 1,8 (таблица 20), обнаруживали значительное ингибирование роста опухоли во время исследования. В качестве контроля использовали контрольное анти-HER2 антитело (тео-hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1), контрольное антитело huMA79b.v28 (тео-huMA79b.v28-NC(A118C) и контрольное антитело anti-супоCD79b(ch10D10) (тео-анти-супоCD79b(ch10D10)-NC(A118C)). «Тео» означает сконструированное на основе цистеина антитело, а «hu» означает гуманизированное антитело.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения

Настоящее изобретение относится к способам, композициям, наборам и промышленным изделиям, применяемым для идентификации композиций, используемых для лечения гемопоэтической опухоли у млекопитающих, и к способам применения таких композиций согласно изобретению в указанных целях.

Подробное описание указанных способов, композиций, наборов и промышленных изделий приводится ниже.

I. Общие методы

Настоящее изобретение может быть осуществлено, если это не оговорено особо, стандартными методами, используемыми в молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), в микробиологии, биологии клетки, биохимии и иммунологии, и известными специалистам. Такие методы подробно описаны в литературе, например, в руководствах «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, и в современных периодических изданиях); «PCR: The Polymerase Chain Reaction», (Mullis et al., ed., 1994); «A Practical Guide to Molecular Cloning» (Perbal Bernard V., 1988); «Phage Display: A Laboratory Manual» (Barbas et al., 2001).

II. Определения

Для лучшего понимания настоящего изобретения, ниже приводятся определения терминов, используемых в настоящем описании, при этом, если это не оговорено особо, подразумевается, что термины, используемые в единственном числе, могут означать и существительные во множественном числе, и наоборот. Если при определении любого термина в этом описании возникают противоречия с определением, приводимым в любом документе, вводимом в настоящее описание посредством ссылки, то они могут быть урегулированы в соответствии с описанием, представленным ниже.

Используемый здесь термин «маркер В-клеточной поверхности» или «антиген В-клеточной поверхности» означает антиген, экспрессируемый на поверхности В-клетки, на которую может быть направлен антагонист, связывающийся с этой клеткой, включая, но не ограничиваясь ими, антитела против антигена В-клеточной поверхности или растворимой формы антигена В-клеточной поверхности, обладающие способностью ингибировать связывание лиганда с природным В-клеточным антигеном. Примерами маркеров В-клеточной поверхности являются маркеры поверхности лейкоцитов, такие как CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 и CD86 (описание см. в публикации «The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition, 1997, ed. Barclay et al., Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Другими маркерами В-клеточной поверхности являются RP105, FcRH2, В-клеточный CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btlg, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA и 239287. Маркер В-клеточной поверхности, представляющий особый интерес, экспрессируется преимущественно на В-клетках, в отличие от других не-В-клеточных тканей млекопитающего, и может экспрессироваться как на В-клетках-предшественниках, так и на зрелых В-клетках.

Используемый здесь термин «CD79b» означает любой природный CD79b, происходящий от любых позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек, собакоподобные обезьяны (супо)) и грызуны (например, мыши и крысы), если это не оговорено особо. Человеческий CD79b также обозначается здесь «PRO36249» (SEQ ID NO: 2) и кодируется нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO: 1), также обозначаемой здесь «DNA225786». CD79b собакоподобных обезьян также обозначается здесь «супо-CD79b» или «PRO283627» (SEQ ID NO: 239) и кодируется нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO: 238), также обозначаемой здесь «DNA548455». Термин «CD79b» охватывает «полноразмерный» непротессированный CD79b, а также любую форму CD79b, которая образуется в результате процессинга в

клетке. Этот термин также охватывает природные варианты CD79b, например, сплайсированные варианты, аллельные варианты, и изоформы. Описанные здесь полипептиды CD79b могут быть выделены из различных источников, например, из человеческих тканей или из других источников, либо они могут быть получены рекомбинантными методами или методами синтеза. «Нативная последовательность полипептида CD79b» включает полипептид, имеющий такую же аминокислотную последовательность, как и соответствующий природный полипептид CD79b. Такие полипептиды CD79b с нативной последовательностью могут быть выделены из природного источника, либо они могут быть получены рекомбинантными методами или методами синтеза. Термин «полипептид CD79b с нативной последовательностью», в частности, охватывает природные усеченные или секретируемые формы специфического полипептида CD79b (например, последовательность внеклеточного домена), природные варианты (например, альтернативно сплайсированные формы) и природные аллельные варианты полипептида. В некоторых вариантах изобретения описанные здесь полипептиды CD79b с нативной последовательностью представляют собой зрелые полипептиды или полноразмерные полипептиды с нативной последовательностью, содержащие полноразмерные аминокислотные последовательности, представленные в описании графического материала. В описании графического материала, старт- и стоп-кодоны (если они указаны) показаны жирным шрифтом и подчеркнуты. Остатки нуклеиновой кислоты, обозначенные “N” в описании графического материала, представляют собой любые остатки нуклеиновой кислоты. Хотя полипептиды CD79b, указанные в описании графического материала, начинаются с метиониновых остатков, обозначенных в данном описании как положение аминокислоты 1, однако, возможно, что в качестве начального аминокислотного остатка для полипептидов CD79b могут быть использованы и другие метиониновые остатки, расположенные выше или ниже от положения аминокислоты 1, как показано в описании графического материала.

Используемые здесь термины «MA79b» или «мышинное анти-CD79b антитело» или «мышинное антитело против CD79b», в частности, означают мышинное моноклональное анти-CD79b антитело, которое содержит вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 10 (фигуры 7A-B) и вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 14 (фигуры 8A-B). Мышинное моноклональное анти-CD79b антитело может быть закуплено у коммерческих фирм, таких как Biomeda (антитело против человеческого CD79b; Foster City, CA), VDbioscience (антитело против человеческого CD79b; San Diego, CA) или Ancell (антитело против человеческого CD79b; Bayport, MN), либо оно может быть выделено из гибридомного клона 3A2-2E7, депонированного в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под депозитарным номером HB11413, присвоенным ATCC 20 июля 1993 г.

Используемый здесь термин «chMA79b» или «химерное антитело MA79b», в частности, означает химерное антитело против человеческого CD79b (описанное ранее в заявке на патент США № 11/462336, поданной 3 августа 2006 г.), где указанное химерное анти-CD79b антитело содержит легкую цепь SEQ ID NO: 4 (фигура 4). Легкая цепь SEQ ID NO: 4 также содержит вариабельный домен SEQ ID NO: 10 (фигуры 7A-B) и константный домен легкой цепи человеческого IgG1. Химерное анти-CD79b антитело также содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 6 (фигура 6). Тяжелая цепь SEQ ID NO: 6 также содержит вариабельный домен SEQ ID NO: 14 (фигуры 8A-B) и константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1.

Используемый здесь термин «анти-супоCD79b» или «антитело против CD79b

собакоподобных обезьян» означает антитела, которые связываются с CD79b собакоподобных обезьян (SEQ ID NO: 239 фигуры 43) (как было описано ранее в заявке на патент США № 11/462336, поданной 3 августа 2006 г.). Используемый здесь термин «анти-супоCD79b (ch10D10)» или «ch10D10» означает химерное антитело против CD79b собакоподобных обезьян (описанное ранее в заявке на патент США № 11/462336, поданной 3 августа 2006 г.), которое связывается с CD79b собакоподобных обезьян (SEQ ID NO: 239 фигуры 43). Анти-супоCD79b(ch10D10) или ch10D10 представляет собой химерное антитело против CD79b собакоподобных обезьян, которое содержит легкую цепь SEQ ID NO: 241 (фигура 45). Анти-супоCD79b(ch10D10) или ch10D10 также содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 243 (фигура 47).

Используемый здесь термин «MA79b-гибрид» или «MA79b-связанное гуманизированное антитело» или «huMA79b-гибрид», в частности, означает гибрид, полученный путем присоединения гипервариабельных областей, происходящих от мышиного анти-CD79b антитела (MA79b), к акцепторной последовательности человеческой консенсусной VL каппа I (huKI) и человеческой консенсусной VH подгруппы III (huIII) с заменами R71A, N73T и L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)) (см. пример 1A и фигуры 7 (SEQ ID NO: 11) и 8 (SEQ ID NO: 15)).

Используемый здесь термин «модификация» аминокислотного остатка/положения означает замену в первичной аминокислотной последовательности по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью, где указанная замена происходит в результате модификации последовательности, включающей указанные аминокислотные остатки/положения. Так, например, типичными модификациями являются замена остатка (или остатка в указанном положении) другим аминокислотным остатком (например, консервативная или неконсервативная замена), инсерция одной или нескольких (обычно менее чем 5 или 3) аминокислот, смежных с указанным остатком/положением, и делеция указанного остатка/положения. Термин «аминокислотная замена» или ее вариант означает замену имеющегося аминокислотного остатка в предварительно определенной (исходной) аминокислотной последовательности другим аминокислотным остатком. Вообще говоря и предпочтительно, модификация приводит к изменению по меньшей мере одной физико-биохимической активности полипептидного варианта по сравнению с активностью полипептида, содержащего исходную аминокислотную последовательность (или «последовательность дикого типа»). Так, например, в случае антител, измененной физико-биохимической активностью может быть аффинность связывания с молекулой-мишенью, способность связываться с молекулой-мишенью и/или влияние на связывание с молекулой-мишенью.

Используемый здесь термин «антитело» применяется в самом широком смысле, а в частности, охватывает отдельные моноклональные анти-CD79b антитела (включая агонисты, антагонисты, нейтрализующие антитела, полноразмерные моноклональные антитела или интактные моноклональные антитела), композиции анти-CD79b антител, обладающие полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, поливалентные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, при условии, что они обладают нужной биологической активностью), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечные анти-CD79b антитела и фрагменты анти-CD79b антител (см. ниже), включая Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv- фрагменты, диантитела, однодоменные антитела (sdAb), при условии, что они обладают нужной биологической или иммунологической активностью. Используемые здесь термины «иммуноглобулин (Ig)» и «антитело» являются синонимами. Антитело может быть человеческим, гуманизированным и/или аффинно зрелым.

Термин «анти-CD79b антитело» или «антитело, которое связывается с CD79b» означает антитело, которое способно связываться с CD79b с аффинностью, достаточной для использования данного антитела в качестве диагностического и/или терапевтического средства, нацеленного на CD79b. Предпочтительно уровень связывания анти-CD79b антитела с неродственным белком, то есть белком, не являющимся CD79b, составляет менее чем примерно 10% от связывания антитела с CD79b, как было определено с помощью, например, радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах изобретения, антитело, связывающееся с CD79b, имеет константу диссоциации (K_d), составляющую ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. В некоторых вариантах изобретения анти-CD79b антитело связывается с эпитопом CD79b, который является консервативным у CD79b различных видов.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или очищено от компонентов его природного окружения. Контаминирующими компонентами его природного окружения являются материалы, негативно влияющие на терапевтическую эффективность антитела, и такими компонентами могут быть ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах изобретения, указанное антитело может быть очищено: (1) на более чем 95% по массе антитела, как может быть определено методом Лаури, а более предпочтительно не более чем на 99% по массе антитела, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков у N-концевой или внутренней части аминокислотной последовательности, что может быть определено с использованием секвенатора, снабженного центрифужным сосудом, или (3) до гомогенности, что может быть подтверждено с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих или в невосстанавливающих условиях с окрашиванием кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Термин «выделенное антитело» включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, если отсутствует по меньшей мере один природный компонент этого антитела. Однако обычно выделенное антитело может быть получено по меньшей мере в одной стадии очистки.

Основная 4-цепочечная молекула антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных молекул вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, а поэтому оно содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, а секретированные антитела IgA могут полимеризоваться с образованием поливалентных конструкций, содержащих 2-5 основных 4-цепочечных молекулы вместе с J-цепью). В случае IgG 4-цепочечная молекула в основном имеет размер примерно 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, а две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет равномерно расположенные внутрицепевые дисульфидные мостики. Каждая H-цепь имеет у своего N-конца переменный домен (V_H), за которым следуют три константных домена (C_H) для каждой из α - и γ -цепей, и четыре C_H -домена для изоформ μ и ϵ . Каждая L-цепь имеет у своего N-конца переменный домен (V_L), за которым следует константный домен (C_L) у его другого конца. V_L расположена на одной линии с V_H , а C_L расположена на одной линии с первым константным доменом тяжелой цепи (C_H1). Очевидно, что конкретные аминокислотные остатки образуют пограничную область между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание V_H и V_L приводит к образованию одного антигенсвязывающего сайта.

Структура и свойства антител различных классов описаны, например, в публикации 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.

Л-цепь, происходящая от антитела позвоночных любого вида, может принадлежать к одному из двух четко различаемых типов, называемых каппа и лямбда, исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов. Иммуноглобулины, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (C_H), могут быть отнесены к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначаемые α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α также подразделены на подклассы, исходя из относительно небольших различий в последовательностях и функциях C_H , например, у человека экспрессируются иммуноглобулины следующих подклассов: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела означают аминоконцевые домены тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может называться «VH». Вариабельный домен легкой цепи может называться «VL». Эти домены в основном являются наиболее вариабельными частями антитела и содержат антигенсвязывающие сайты.

Термин «вариабельный» относится к некоторым сегментам вариабельных доменов, которые имеют значительные отличия в последовательностях различных антител. Домен V опосредует связывание с антигеном и определяет специфичность конкретного антитела к конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределяется по всем вариабельным доменам, состоящим из 110 аминокислот. Но обычно области V состоят из относительно инвариантных сегментов, называемых каркасными областями (FR), состоящими из 15-30 аминокислот, отделенных более короткими областями с гипервариабельностью, называемыми «гипервариабельными областями», каждая из которых имеет длину в 9-12 аминокислот. Каждый вариабельный домен нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, имеющих, главным образом, β -складчатую конфигурацию и соединенных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях образующие часть β -складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга посредством FR, и вместе с гипервариабельными областями другой цепи участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Sth. Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными функциями, такими как участие антитела в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

«Интактное» антитело представляет собой антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, а также C_L и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены человеческой нативной последовательности) или варианты их аминокислотных последовательностей. Интактное антитело предпочтительно обладает одной или несколькими эффекторными функциями.

Используемый здесь термин «оголенное антитело» означает антитело, которое не является конъюгированным с цитотоксической молекулой или радиоактивной меткой.

«Фрагменты антител» содержат часть интактного антитела, а предпочтительно антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела. Примерами фрагментов антител являются Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; диантитела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В одном из вариантов изобретения фрагмент антитела содержит антигенсвязывающий сайт интактного антитела, а поэтому он сохраняет свою способность связываться с антигеном.

В результате гидролиза антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, и один оставшийся "Fc"-фрагмент, название которого указывает на его способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из полноразмерной L-цепи вместе с доменом вариабельной области H-цепи (V_H) и первого константного домена одной тяжелой цепи (C_H1). Каждый Fab-фрагмент является одновалентным в отношении связывания с антигеном, то есть он имеет один антигенсвязывающий сайт. В результате обработки антитела пепсином образуется один крупный F(ab')₂-фрагмент, который приблизительно соответствует двум связанным дисульфидной связью Fab-фрагментам, обладающим двухвалентной антигенсвязывающей активностью и способностью перекрестно связываться с антигеном. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов присутствием нескольких дополнительных остатков у карбокси-конца домена C_H1, включая один или несколько цистеинов, происходящих от шарнирной области антитела. Fab'-SH, используемый в настоящей заявке, представляет собой Fab', в котором цистеиновый(е) остаток(тки) константных доменов имеет(ют) свободную тиоловую группу. F(ab')₂-фрагменты антитела первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, которые имеют расположенные между ними шарнирные цистеины. Специалистам также известны другие методы химического связывания фрагментов антител.

Fc-фрагмент содержит карбокси-концевые части обеих H-цепей, связанных посредством дисульфидных связей. Эффекторные функции антител определяют по последовательностям Fc-области, которые представляют собой также части, распознаваемые Fc-рецепторами (FcR), находящимися на клетках некоторых типов.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полноразмерный антиген-распознающий сайт и антигенсвязывающий сайт. Этот фрагмент состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи, жестко связанных друг с другом нековалентной связью. В одноцепочечном Fv (scFv) один вариабельный домен тяжелой цепи и один вариабельный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером, в результате чего легкая и тяжелая цепи могут ассоциироваться друг с другом с образованием «димерной» структуры, аналогичной структуре двухцепочечных Fv. После укладки этих двух доменов образуется шесть гипервариабельных петель (3 петли, каждая из которых происходит от H- и L-цепи), которые обеспечивают аминокислотные остатки для связывания с антигеном и сообщают антителу специфичность связывания с антигеном. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним, хотя и с меньшей аффинностью, чем весь сайт связывания.

«Одноцепочечные Fv-фрагменты», также обозначаемые "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антитела, которые включают домены V_H и V_L антитела, соединенные в одной полипептидной цепи. Предпочтительно полипептид scFv также

содержит между доменами V_H и V_L полипептидный линкер, который обеспечивает образование scFv со структурой, необходимой для связывания с антигеном. Описание scFv можно найти в работе Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, см. ниже.

Термин “диантитела” означает фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, где указанные фрагменты включают вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи ($VH-VL$). Небольшие фрагменты антител получают путем конструирования scFv-фрагментов (см. предыдущий абзац) с использованием коротких линкеров (примерно 5-10 остатков) между доменами V_H и V_L , так, чтобы достигалось межцепьевое, но не внутрицепьевое, спаривание доменов V , с образованием двухвалентного фрагмента, то есть фрагмента, имеющего два антигенсвязывающих сайта. Диантитела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Биспецифическими диантителами являются гетеродимеры двух «перекрестно связанных» scFv-фрагментов, в которых домены V_H и V_L двух антител присутствуют на различных полипептидных цепях. Диантитела более подробно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993). Триантитела и тетраантитела также описаны в публикации Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Используемый здесь термин “моноклональное антитело” означает антитело, полученное от популяции в основном, гомогенных антител, то есть отдельных антител, входящих в эту популяцию и являющихся идентичными за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах.

Моноклональные антитела являются в высокой степени специфическими и направлены против одной антигенной детерминанты. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо своей специфичности, моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они могут быть синтезированы так, чтобы они не содержали примесей других антител. Термин “моноклональный” не означает, что данное антитело должно быть продуцировано каким-либо конкретным методом. Так, например, моноклональные антитела согласно изобретению могут быть получены с помощью гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al. (1975) Nature 256:495, либо они могут быть получены методами рекомбинантных ДНК в клетках бактерий, эукариотических организмов или растений (см., например, патент США № 4816567). “Моноклональные антитела” могут быть также выделены из фаговых библиотек антител методами, описанными, например, Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

Используемые здесь моноклональные антитела включают, в частности, “химерные” антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящих от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная(ые) цепь(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также включают фрагменты таких антител, при условии, что они обладают нужной биологической активностью (см. патент США № 4816567 и публикацию Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Представляющими интерес

химерными антителами согласно изобретению являются «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменных доменов, происходящие от последовательностей константной области приматов, не являющихся человеком (например, мартышек, человекообразных обезьян и т.п.), и человека.

5 “Гуманизированные формы” нечеловеческих антител (например, антител грызунов) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую от нечеловеческого антитела. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки, происходящие от гипервариабельной области антитела-реципиента, заменены остатками, происходящими от гипервариабельной области нечеловеческого антитела (донорного антитела), такого как мышинное антитело, крысиное антитело, кроличье антитело или антитело приматов, не являющихся человеком, где указанные антитела обладают нужной специфичностью, аффинностью и связывающей способностью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) 10 человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого антитела. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Эти модификации вводят для улучшения свойств антитела. В общих чертах, гуманизированное антитело может содержать в основном все или по меньшей мере 20 один, а обычно два переменных домена, в которых все или почти все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или почти все FR представляют собой FR с последовательностью человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также содержит, но необязательно, по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), 25 обычно области человеческого иммуноглобулина. Более подробное описание см. у Jones et al. *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature* 332:323-329 (1998) и Presta *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). См. также нижеследующие обзорные статьи и цитируемые там работы: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Используемый здесь термин «тио» относится к антителу, сконструированному на основе цистеина, а используемый здесь термин “hu” относится к гуманизированному антителу.

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, имеющее аминокислотную 35 последовательность, которая соответствует аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого у человека и/или полученного любым из методов продуцирования человеческих антител, описанных в настоящей заявке. Это определение человеческого антитела, в частности, исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого антитела. Человеческие 40 антитела могут быть получены различными методами, известными специалистам, включая использование библиотек фагового представления. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Для получения человеческих моноклональных антител могут быть также применены методы, описанные в публикации Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); 45 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk & van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74 (2001). Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано в целях продуцирования таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но у которого были

блокированы эндогенные локусы, например, у иммунизированной мыши с ксенотрансплантатом (см, например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, относящиеся к технологии XENOMOUSETM). См. также, например, публикацию Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006), относящуюся к человеческим антителам, полученным с применением технологии человеческих В-клеточных гибридом.

Используемые здесь термины “гипервариабельная область”, “HVR” или “HV” означают области вариабельного домена антитела, которые являются в данной последовательности гипервариабельными и/или образуют петли определенной структуры. В общих чертах, указанные антитела содержат шесть гипервариабельных областей; три области в VH (H1, H2, H3) и три области в VL (L1, L2, L3). В настоящей заявке используется ряд гипервариабельных областей, которые входят в объем настоящего изобретения. Гипервариабельные области (комплементарность-определяющие области (CDR)) по Кэбату обладают высокой степенью вариабельности последовательности и находят широкое применение (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Вместо определения гипервариабельных областей по Кэбату, Чотия предложил определять гипервариабельные области по локализации структурных петель (Chothia & Lesk, J. Mol.Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Чотия, при нумерации в соответствии с нумерацией Кэбата, варьируется между положениями H32 и H34 в зависимости от длины петли (это происходит потому, что в соответствии со схемой нумерации по Кэбату инсерции находятся в положениях H35A и H35B; при этом, если не присутствует ни 35A, ни 35B, то петля заканчивается в положении 32; если присутствует только 35A, то петля заканчивается в положении 33; а если присутствуют 35A и 35B, то петля заканчивается в положении 34). Определение гипервариабельных областей AbM представляет собой компромисс между “CDR” по Кэбату и “структурными петлями” по Чотия, и такие определения используются в компьютерной программе по моделированию антител Oxford Molecular's AbM. «Контактные» гипервариабельные области определяют исходя из анализа имеющихся сложных кристаллических структур. Остатки каждой из этих гипервариабельных областей приводятся ниже.

Петля	По Кэбату	AbM	По Чотия	Контактные области
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Нумерация по Кэбату)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерация по Чотия)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Термин “гипервариабельные области” может включать “удлиненные гипервариабельные области”, а именно: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL; и 26-35B (H1), 50-65, 47-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки вариабельных доменов для каждого из указанных определений пронумерованы по Кэбату и др., см. выше.

“Каркасными” или “FR” остатками являются остатки вариабельных доменов, за исключением остатков гипервариабельных областей, определенных выше.

Используемый здесь термин “остаток вариабельного домена, пронумерованный по Кэбату” или “положение аминокислоты, пронумерованное по Кэбату” и их варианты

означает систему, используемую для нумерации переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи антител, описанной в справочнике по антителам Кэбата (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). В соответствии с этой системой нумерации фактическая первичная аминокислотная последовательность может содержать меньшее число или дополнительное число аминокислот, соответствующее укороченной или удлиненной FR- или CDR-области переменного домена. Так, например, переменный домен тяжелой цепи может включать инсерцию одной аминокислоты (остатка 52a в соответствии с нумерацией Кэбата) после остатка 52 H2, и остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.п., в соответствии с нумерацией Кэбата), встроенные после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Кэбату может быть осуществлена после выравнивания его последовательности в областях гомологии со «стандартной» последовательностью, пронумерованной по Кэбату.

Система нумерации по Кэбату обычно применяется к остаткам в переменном домене (приблизительно остаткам 1-107 легкой цепи и остаткам 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Европейская система нумерации «EU» или «Eu-индекс» обычно применяется к остаткам константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, EU-индекс описан у Kabat et al., см. выше). Термин «EU-индекс по Кэбату» означает нумерацию остатков человеческого антитела IgG1 в соответствии с Европейской системой нумерации. Если это не указано в настоящем описании, то указание на число остатков в переменном домене антител означает остатки, пронумерованные в соответствии с системой нумерации Кэбата. Если это не указано в настоящем описании, то указание на число остатков в константном домене антител означает остатки, пронумерованные в соответствии с Европейской системой нумерации (см., например, предварительную заявку на патент США № 60/640323; на фигурах дана Европейская нумерация).

«Аффиннозрелым» антителом является антитело, имеющее одну или несколько модификаций в одной или нескольких HVR, где указанные модификации приводят к повышению аффинности антитела к антигену, по сравнению с родительским антителом, которое не имеет такую(их) модификацию(ий). Предпочтительные аффиннозрелые антитела имеют наномолярные или даже пикомолярные аффинности к антигену-мишени. Аффиннозрелые антитела получают методами, известными специалистам. В публикации Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) описано созревание аффинности посредством перестановки доменов VH и VL. Неспецифический мутагенез HVR и/или каркасных остатков описан в публикациях Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

«Блокирующее» антитело или «антитело-антагонист» представляет собой антитело, ингибирующее или снижающее биологическую активность антигена, с которым оно связывается. Предпочтительные блокирующие антитела или антитела-антагонисты в основном или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

Используемый здесь термин «антитело-агонист» означает антитело, которое имитирует по меньшей мере одну из функциональных активностей представляющего интерес полипептида.

«Видоспецифическое антитело», например, антитело млекопитающего против человеческого IgE, представляет собой антитело, которое обладает более высокой аффинностью связывания с антигеном, происходящим от млекопитающего первого

вида, по сравнению с гомологом антигена, происходящего от млекопитающего второго вида. Обычно видоспецифическое антитело «специфически связывается» с человеческим антигеном (то есть имеет величину аффинности связывания (K_d) не более чем примерно 1×10^{-7} М, предпочтительно не более чем примерно 1×10^{-8} , а наиболее предпочтительно не более чем примерно 1×10^{-9} М), тогда как аффинность связывания с гомологом антигена, происходящего от млекопитающего второго вида, не являющегося человеком, по меньшей мере примерно в 50 раз или по меньшей мере примерно в 500 раз, или по меньшей мере примерно в 1000 раз ниже аффинности связывания с человеческим антигеном. Видоспецифическое антитело может представлять собой любое из антител различных типов, определенных выше, но предпочтительно таким антителом является гуманизированное или человеческое антитело.

Термин «аффинность связывания» по существу означает силу суммарных нековалентных взаимодействий одного сайта связывания молекулы (например, антитела) с его партнером по связыванию (например, с антигеном). Если это не оговорено особо, то используемый здесь термин «аффинность связывания» означает природную аффинность связывания, при которой происходит взаимодействие 1:1 между членами пар связывания (например, антитела с антигеном). Аффинность связывания молекулы X с ее партнером Y, в общих чертах, может называться константой диссоциации (K_d). Аффинность может быть определена стандартными методами, известными специалистам, включая описанные здесь методы. Низкоаффинные антитела обычно связываются с антигеном с меньшей скоростью и имеют тенденцию легко диссоциироваться, тогда как высокоаффинные антитела обычно связываются с антигеном с большей скоростью и имеют тенденцию оставаться связанными в течение более длительного периода времени. Специалистам в данной области известны различные методы измерения аффинности связывания, и для осуществления настоящего изобретения может быть применен любой из этих методов. Конкретные репрезентативные варианты осуществления изобретения описаны ниже.

Используемое здесь определение «или выше», если оно употребляется по отношению к аффинности связывания, означает более высокий уровень связывания молекулы с его партнером по связыванию. Используемое здесь определение «или выше», если оно употребляется в настоящей заявке, означает более сильное связывание, определяемое меньшим численным значением K_d . Так, например, антитело, которое имеет аффинность связывания с антигеном «0,6 нМ или выше», означает антитело, которое имеет аффинность связывания с антигеном $<0,6$ нМ, то есть 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ и т.п., или любую величину менее чем 0,6 нМ.

В одном из вариантов изобретения « K_d » или «величину K_d » согласно изобретению определяют с помощью анализа на связывание с радиоактивно меченым антигеном (РИА), осуществляемого с использованием Fab-варианта представляющего интерес антитела и его антигена, описанного ниже, где указанный анализ позволяет измерять аффинность связывания Fab с антигеном в растворе путем уравнивания Fab минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии титрационного набора немеченных антигенов, с последующей иммобилизацией связанного антигена на планшете, сенсibilизированном антителом против Fab-фрагмента (Chen et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881). В целях создания соответствующих условий для анализа, микротитрационные планшеты (Dynex) сенсibilизируют в течение ночи 5 мкг/мл связывающего анти-Fab антитела (Cappel Labs) в 50 мМ карбонате натрия (pH 9,6), а затем блокируют 2%-ым (масс./об.) альбумином бычьей сыворотки в PBS в течение 2-5

часов при комнатной температуре (приблизительно при 23°C). В неадсорбирующем планшете (Nunc # 269620) 100 пМ или 26 пМ [125 I]-антигена смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, в соответствии с оценкой анти-VEGF антитела, Fab-12, Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи, однако, для гарантии достижения равновесия, инкубирование может быть проведено в течение более длительного периода времени (например, 65 часов). После этого смеси переносят в планшеты для иммобилизации и инкубируют при комнатной температуре (например, в течение одного часа). Затем раствор удаляют, и планшеты восемь раз промывают 0,1% Твином-20 в PBS. После сушки планшеты добавляют 150 мкл/лунку сцинтилляционной жидкости (MicroScintTM-20; Packard), и планшеты подсчитывают на гамма-счетчике Topcount (Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, которые составляют 20% или менее от максимального связывания, отбирают для их использования в анализах на конкурентное связывание.

В соответствии с другим вариантом изобретения K_d или величину K_d измеряют в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcoreTM-2000 или BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с использованием чипов CM5 с иммобилизованным на них антигеном при величине единиц отклика (RU), составляющей ~10. Вкратце, биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщиков. Антиген разводят 10 мМ уксусной кислотой, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мМ), а затем инъецируют при скорости потока 5 мкл/минуту до достижения величины единиц отклика (RU) связанного белка, составляющей ~10. После инъекции антигена, для блокирования непрореагировавших групп вводят 1М этаноламин. Для измерения кинетики реакции вводят инъекции двукратных серийных разведений Fab (0,78 нМ-500 нМ) в PBS, содержащем 0,05% Твина® 20 (PBST) при 25°C и при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорость ассоциации (k_{on}) и скорость диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием простой лангмюровской модели связывания 1:1 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) при одновременном построении сенсорограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесной диссоциации (K_d) вычисляют как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al. (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Если скорость ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, как было определено выше методом поверхностного плазмонного резонанса, то такая скорость ассоциации может быть определена методом гашения флуоресценции, который позволяет измерять увеличение или уменьшение интенсивности флуоресцентного излучения (возбуждение = 295 нм; излучение = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C для 20 нМ антитела против антигена (в Fab-форме) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, как было измерено на спектрометре, таком как спектрофотометр, снабженный ограничителем потока (Aviv Instrumentts), или на спектрофотометре SLM-Aminco серии 8000 (ThermoSpectronic), снабженном кюветой для перемешивания, содержащей красный краситель.

«Скорость ассоциации» («on-rate») или « k_{on} » согласно изобретению может быть также определена описанным выше методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcoreTM-2000 или BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Используемые здесь термины “по существу аналогичный” или “по существу тот же

самый» означают достаточно высокую степень сходства между двумя численными величинами (обычно между одной величиной, соответствующей антителу согласно изобретению, и другой величиной, соответствующей эталонному/сравниваемому антителу), а именно, такую степень сходства, которая позволяла бы специалисту в данной области считать различие между этими двумя величинами несущественным или биологически и/или статистически незначимым с точки зрения их биологических свойств, определяемых указанными величинами (например, величинами Kd). Различия между указанными двумя величинами составляет предпочтительно менее чем примерно 50%, более предпочтительно менее чем примерно 40%, еще более предпочтительно менее чем примерно 30%, еще более предпочтительно менее чем примерно 20%, а наиболее предпочтительно менее чем примерно 10% по сравнению с величинами эталонного/сравниваемого антитела.

Используемые здесь термины «по существу пониженный» или «по существу отличающийся» означают достаточно высокую степень различия между двумя численными величинами (обычно между одной величиной, соответствующей антителу согласно изобретению, и другой величиной, соответствующей эталонному/сравниваемому антителу), а именно, такую степень различия, которая позволяла бы специалисту в данной области считать такое различие между этими двумя величинами статистически значимым с точки зрения их биологических свойств, определяемых указанными величинами (например, величинами Kd, НАМА-ответ). Различия между указанными двумя величинами составляет предпочтительно более чем примерно 10%, более предпочтительно более чем примерно 20%, еще более предпочтительно более чем примерно 30%, еще более предпочтительно более чем примерно 40%, а наиболее предпочтительно более чем примерно 50% по сравнению с величинами эталонного/сравниваемого антитела.

Термин «антиген» означает предварительно определенный антиген, с которым может селективно связываться антитело. Антигеном-мишенью может быть полипептид, углевод, нуклеиновая кислота, липид, гаптен или другое природное или синтетическое соединение. Предпочтительным антигеном-мишенью является полипептид.

Используемый здесь термин «акцепторная человеческая каркасная область» означает каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, происходящую от человеческой каркасной области иммуноглобулина или от человеческой консенсусной каркасной области. Акцепторная человеческая каркасная область, «происходящая от» человеческой каркасной области иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, может содержать одну и ту же аминокислотную последовательность, либо она может содержать аминокислотную последовательность с уже имеющимися изменениями. Если в аминокислотной последовательности уже имелись изменения, то предпочтительно, чтобы число таких изменений не превышало 5, а предпочтительно 4 или менее, или 3 или менее. Если аминокислотные изменения уже присутствовали в VH, то предпочтительно, чтобы эти изменения были только в трех, двух или в одном из положений 71H, 73H и 78H; так, например, аминокислотными остатками в этих положениях могут быть 71A, 73T и/или 78A. В одном из вариантов изобретения акцепторная человеческая каркасная область VL идентична последовательности человеческой каркасной области VL иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной последовательности.

«Человеческая консенсусная каркасная область» представляет собой каркасную область, которая включает наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки,

используемые при выборе каркасных последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина. Обычно последовательности VL или VH человеческого иммуноглобулина выбирают из подгруппы последовательностей переменных доменов. В основном подгруппа последовательностей определяется по Кэбату и др. В одном из вариантов изобретения, для VL, такой подгруппой является подгруппа каппа I по Кэбату и др. В одном из вариантов изобретения, для VH, такой подгруппой является подгруппа III по Кэбату и др.

«Консенсусная каркасная область VH подгруппы III» содержит консенсусную последовательность, выделенную из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи подгруппы III по Кэбату и др. В одном из вариантов изобретения аминокислотная последовательность консенсусной каркасной области VH подгруппы III содержит по меньшей мере часть каждой из нижеследующих последовательностей или все эти последовательности: EVQLVESGGGLYQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

«Консенсусная каркасная область VL подгруппы I» содержит консенсусную последовательность, выделенную из аминокислотных последовательностей переменной легкой цепи каппа подгруппы I по Кэбату и др. В одном из вариантов изобретения аминокислотная последовательность консенсусной каркасной области VL подгруппы I содержит по меньшей мере часть каждой из нижеследующих последовательностей или все эти последовательности: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 139)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140)-L2-GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

«Немодифицированная человеческая каркасная область» представляет собой человеческую каркасную область, имеющую такую же аминокислотную последовательность, как и акцепторная человеческая каркасная область, например, в ней отсутствуют замены человеческих аминокислот на нечеловеческие аминокислоты, как и в акцепторной человеческой каркасной области.

Используемый здесь термин «модифицированная гипервариабельная область» означает гипервариабельную область, содержащую одну или несколько (например, от одной и примерно до 16) аминокислотных замен.

Используемый здесь термин «немодифицированная гипервариабельная область» означает гипервариабельную область, имеющую такую же аминокислотную последовательность, как и последовательность нечеловеческого антитела, от которого она происходит, то есть, последовательность, не содержащую одной или нескольких аминокислотных замен.

Антитело, которое «связывается» с представляющим интерес антигеном, например, с опухолеассоциированным полипептидным антигеном-мишенью, представляет собой антитело, связывающееся с антигеном с аффинностью, которая является достаточной для того, чтобы это антитело можно было использовать в качестве терапевтического средства для доставки в клетку или в ткань, экспрессирующую этот антиген, и чтобы это антитело не обладало бы значительной перекрестной реактивностью с другими белками. В указанных вариантах изобретения уровень связывания антитела с белком, который «не является мишенью», составляет менее чем примерно 10% от уровня связывания антитела с его конкретным белком-мишенью, как было определено с помощью анализа, проводимого с применением клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS) или радиоиммунопреципитации (РИА). Что касается связывания

антитела с молекулой-мишенью, то термин «специфически связывающееся с» или «специфически связывается с» конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде-мишени или «является специфичным к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени означает, что такое связывание антитела

5 значительно отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может быть измерено, например, путем определения уровня связывания молекулы по сравнению с уровнем связывания контрольной молекулы, которая по существу представляет собой молекулу, имеющую аналогичную структуру, но не обладающую связывающей активностью. Так, например, специфическое связывание

10 может быть определено путем оценки конкурентного связывания с контрольной молекулой, которая является аналогичной данной мишени, например, по избытку немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание обнаруживается, когда связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. Используемый здесь термин «специфически связывающееся с» или

15 «специфически связывается с» конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде-мишени или «является специфичным к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени может, например, означать, что данная молекула имеет K_d по отношению к мишени по меньшей мере примерно 10^{-4} М,

20 альтернативно, по меньшей мере примерно 10^{-5} М, альтернативно, по меньшей мере примерно 10^{-6} М, альтернативно, по меньшей мере примерно 10^{-7} М, альтернативно, по меньшей мере примерно 10^{-8} М, альтернативно, по меньшей мере примерно 10^{-9} М, альтернативно, по меньшей мере примерно 10^{-10} М, альтернативно, по меньшей мере

25 примерно 10^{-11} М, альтернативно, по меньшей мере примерно 10^{-12} М или более. В одном из вариантов изобретения термин «специфическое связывание» означает связывание, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, но в основном не связывается с любым другим полипептидом или полипептидным эпитопом.

30 Антитело, которое «ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих полипептид CD79b» или «рост-ингибирующее антитело», представляет собой антитело, которое значительно ингибирует рост раковых клеток, экспрессирующих или сверхэкспрессирующих соответствующий полипептид CD79b. Полипептидом CD79b может быть трансмембранный полипептид, экспрессируемый на поверхности раковых

35 клеток, либо им может быть полипептид, продуцируемый и секретируемый раковыми клетками. Предпочтительные рост-ингибирующие анти-CD79b антитела ингибируют рост CD79b-экспрессирующих опухолевых клеток более, чем на 20%, предпочтительно примерно на 20%-50%, а еще более предпочтительно более чем на 50% (примерно на 50%-100%), по сравнению с соответствующим контролем, который обычно представляет

40 собой опухолевые клетки, не обработанные тестируемым антителом. В одном из вариантов изобретения ингибирование роста может быть измерено при концентрации антитела, составляющей примерно 0,1-30 мкг/мл или примерно 0,5-200 нМ в клеточной культуре, где указанное ингибирование роста определяют через 1-10 дней после обработки опухолевых клеток антителом. Ингибирование роста опухолевых клеток

45 *in vivo* может быть определено различными методами, описанными ниже в разделе «Экспериментальные примеры». Указанное антитело ингибирует рост *in vivo*, если введение анти-CD79b антитела в количестве примерно 1 мкг/кг - примерно 100 мг/кг массы тела приводит к снижению размера опухоли или пролиферации опухолевых

клеток в течение периода времени примерно от 5 дней до 3 месяцев, а предпочтительно примерно от 5 до 30 дней с момента первого введения антитела.

Антитело, которое “индуцирует апоптоз”, представляет собой антитело, которое индуцирует запрограммированную клеточную гибель, как было определено по связыванию с аннексином V, фрагментации ДНК, сморщиванию клеток, расширению эндоплазматического ретикулума, фрагментации клеток и/или по образованию мембранных везикул (называемых апоптотическими тельцами). Такой клеткой обычно является клетка, сверхэкспрессирующая полипептид CD79b. Предпочтительной клеткой являются опухолевые клетки, например, гемопозитические клетки, такие как В-клетки, Т-клетки, базофилы, эозинофилы, нейтрофилы, моноциты, тромбоциты или эритроциты. Для оценки клеточных событий, ассоциированных с апоптозом, существуют различные методы. Так, например, транслокация фосфатидилсерина (PS) может быть определена по связыванию с аннексином; фрагментация ДНК может быть оценена по образованию ДНК-лэддера; а конденсация ядра/хроматина вместе с фрагментацией ДНК может быть оценена по любому увеличению гиподиплоидных клеток. Предпочтительно антителом, индуцирующим апоптоз, является антитело, которое в анализе на связывание с аннексином приводит примерно к 2-50-кратному, предпочтительно примерно к 5-50-кратному, а наиболее предпочтительно примерно к 10-50-кратному индуцированию связывания с аннексином по сравнению с необработанными клетками.

Антителом, которое «индуцирует гибель клеток», является антитело, которое превращает жизнеспособные клетки в нежизнеспособные клетки. Такими клетками являются клетки, экспрессирующие полипептид CD79b, и клетки определенного типа, которые специфически экспрессируют или сверхэкспрессируют полипептид CD79b. Указанными клетками могут быть раковые или нормальные клетки конкретного типа. Полипептидом CD79b может быть трансмембранный полипептид, экспрессируемый на поверхности раковых клеток, либо им может быть полипептид, продуцируемый и секретируемый раковыми клетками. Указанными клетками могут быть раковые клетки, например, В-клетки или Т-клетки. Гибель клеток *in vitro* может быть определена при отсутствии комплемента и иммунных эффекторных клеток для идентификации гибели клеток, индуцированной антитело-зависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC). Таким образом, анализ на гибель клеток может быть осуществлен с использованием термоинактивированной сыворотки (то есть при отсутствии комплемента) и при отсутствии иммунных эффекторных клеток. Для того чтобы определить, может ли данное антитело индуцировать гибель клеток, может быть оценена потеря целостности их мембраны путем поглощения йодида пропидия (PI), трипанового синего (см. Moore et al. *Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) или 7AAD по сравнению с необработанными клетками. Предпочтительными антителами, индуцирующими гибель клеток, являются антитела, индуцирующие поглощение PI в анализе на поглощение PI в клетках BT474.

Термин «эффекторные функции» антитела означает биологические активности, приписываемые Fc-области (Fc-области с нативной аминокислотной последовательностью или Fc-области с измененной аминокислотной последовательностью) антитела и варьирующие в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антител являются: связывание с C1q и комплемент-зависимая цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антитело-зависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; ингибирование функции рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора); и активация В-клеток.

Используемый здесь термин «Fc-область» означает C-концевую область тяжелой

цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и Fc-области с измененной последовательностью. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, однако, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется как фрагмент, простирающийся от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до карбокси-конца. С-концевой лизин (остаток 447 согласно Европейской системе нумерации) Fc-области может быть удален, например, в процессе продуцирования или очистки антитела, либо посредством рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. В соответствии с этим, композиция интактных антител может включать популяции антител со всеми удаленными остатками K447, популяции антител с остатками K447, которые не были удалены, и популяции антител со смесью антител, в которых присутствует или отсутствует остаток K447.

«Функциональная Fc-область» обладает «эффекторной функцией» Fc-области с нативной последовательностью. Репрезентативными эффекторными функциями являются связывание с C1q; CDC; связывание с Fc-рецептором; ADCC; фагоцитоз; ингибирование функции рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т.п. Для достижения эффекторных функций обычно необходимо, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела), и такие эффекторные функции могут быть оценены с помощью различных анализов, описанных, например, в разделе «Определения» настоящей заявки.

«Fc-область с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности природной Fc-области. Человеческими Fc-областями с нативной последовательностью являются Fc-область нативной последовательности человеческого IgG1 (не-A и A-аллотипов); Fc-область нативной последовательности человеческого IgG2; Fc-область нативной последовательности человеческого IgG3; и Fc-область нативной последовательности человеческого IgG4, а также их природные варианты.

«Вариант Fc-области» содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от нативной последовательности Fc-области по меньшей мере одной аминокислотной модификацией, а предпочтительно одной или несколькими аминокислотными заменами. Предпочтительно вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, например, по меньшей мере замену примерно 1-10 аминокислот, а предпочтительно примерно 1-5 аминокислот, по сравнению с нативной последовательностью Fc-области или Fc-области родительского полипептида. Вариант Fc-области, описанный в настоящей заявке, предпочтительно по меньшей мере примерно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 90%, а наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 95% гомологичен нативной последовательности Fc-области и/или Fc-области родительского полипептида.

“Антитело-зависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность” или “ADCC” означает форму цитотоксичности, при которой секретируется Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, на природных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), что позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с антиген-несущими клетками-мишенями и тем самым уничтожать эти клетки-мишени под действием цитотоксинов. Эти антитела «вооружают» цитотоксические клетки и являются абсолютно необходимыми для такого цитолиза. Первичные клетки, опосредующие ADCC, то есть NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Данные, полученные для экспрессии FcR на

гемопоезических клетках, систематизированы в таблице 3 на странице 464 Ravetch & Kinet *Annu. Rev. Immunol.* (1991) 9:457-92. Для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ на ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патентах США №№ 5500362 или 5821337. Эффекторными клетками, подходящими для таких анализов, являются моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на модели животного, такой как модель, описанная Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95:652-656 (1998).

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является человеческий FcR с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является FcR, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор), и рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторами FcγRII являются FcγRIIA (“активирующий рецептор”) и FcγRIIB (“ингибирующий рецептор”), которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) (см. обзор M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). FcR описаны в публикациях Ravetch & Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Используемый здесь термин “FcR” также охватывает и другие FcR, включая FcR, которые будут идентифицированы в будущем. Этот термин также включает рецептор, имеющийся у новорожденных, FcRn, который является ответственным за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и время полужизни полипептидов, связывающихся с человеческим FcRn с высокой аффинностью связывания, могут быть проанализированы, например, у трансгенных мышей или в трансфицированных человеческих клеточных линиях, экспрессирующих человеческий FcRn, или у приматов, которым были введены полипептиды с вариантом Fc-области. В WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител, обладающих повышенной или пониженной активностью связывания с FcR. См., также, например, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

«Человеческие эффекторные клетки» представляют собой лейкоциты, экспрессирующие один или несколько FcR и обладающие эффекторными функциями. Предпочтительно указанные клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и обладают эффекторной ADCC-функцией. Примерами человеческих лейкоцитов, опосредующих ADCC, являются моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), природные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом предпочтительными являются МКПК и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например, из крови.

«Комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC» означает лизис клеток-мишеней в присутствии комплемента. Классический путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связываются с их когнатным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ на CDC, например, как

описано Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). Полипептидные варианты, имеющие модифицированные аминокислотные последовательности Fc-области (полипептиды с вариантом Fc-области) и обладающие повышенной или пониженной способностью связываться с C1q, описаны в патенте США № 6194551B1 и в WO99/51642. См. также Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

Термин «антитело, содержащее Fc-область» означает антитело, включающее Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с Европейской системой нумерации EU) Fc-области может быть удален, например, в процессе очистки антитела или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей это антитело. В соответствии с этим, композиция, содержащая антитело, имеющее Fc-область согласно изобретению, может содержать антитело с остатком K447; антитело, где все K447 были удалены; или смесь антител, содержащих и не содержащих остаток K447.

«Внеклеточный домен» полипептида CD79b или «ECD» представляет собой форму полипептида CD79b, в основном не содержащего трансмембранных и цитоплазматических доменов. Обычно ECD полипептида CD79b составляет менее 1% от указанных трансмембранных и/или цитоплазматических доменов, а предпочтительно менее чем 0,5% таких доменов. Следует отметить, что любой из трансмембранных доменов, идентифицированных для полипептидов CD79b согласно изобретению, идентифицируют в соответствии с критериями, обычно применяемыми специалистами для идентификации гидрофобного домена такого типа. Точные границы трансмембранного домена могут варьировать, но наиболее вероятно, что они отличаются не более чем примерно на 5 аминокислот у любого конца первоначально идентифицированного домена. Поэтому внеклеточный домен полипептида CD79b может содержать, но необязательно, примерно 5 или менее аминокислот на любой стороне пограничной области «трансмембранный домен/внеклеточный домен», идентифицированной, как описано в примерах или в описании настоящей заявки, и такие полипептиды, содержащие или не содержащие присоединенный к ним сигнальный пептид, и нуклеиновая кислота, кодирующая эти полипептиды, входят в объем настоящего изобретения.

Предполагаемая локализация «сигнальных пептидов» описанного здесь полипептида CD79b может быть указана в описании настоящей заявки и/или в описании графического материала. Однако следует отметить, что С-концевая граница сигнального пептида может варьировать, но наиболее вероятно, что она отличается не более чем примерно на 5 аминокислот с любой стороны С-концевой границы сигнального пептида, первоначально идентифицированного в настоящей заявке, где указанная С-концевая граница сигнального пептида может быть идентифицирована в соответствии с критериями, обычно применяемыми специалистами для идентификации элемента аминокислотной последовательности такого типа (например, Nielsen et al., *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) и von Heinje et al., *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Кроме того, также известно, что в некоторых случаях отщепление сигнальной последовательности от секретированного полипептида не является полностью равномерным, что приводит к образованию более чем одной секретируемой молекулы. Такие зрелые полипептиды, в которых сигнальный пептид отщепляется в пределах не более чем примерно 5 аминокислот с любой стороны от С-концевой границы сигнального пептида, идентифицированного в настоящей заявке, и полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, входят в объем настоящего изобретения.

Термин «вариант полипептида CD79b» означает полипептид CD79b, а

предпочтительно активный полипептид CD79b, определенный в настоящем описании и имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% идентична полноразмерной последовательности нативного полипептида CD79b, описанного в настоящей заявке; последовательности полипептида CD79b, не

5 содержащего сигнального пептида, описанного в настоящей заявке; последовательности внеклеточного домена полипептида CD79b, содержащего или не содержащего сигнальный пептид, описанный в настоящей заявке; или последовательности любого другого фрагмента полноразмерного полипептида CD79b, описанного в настоящей заявке (такого как полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой, которая

10 представляет собой лишь часть полноразмерной последовательности, кодирующей полноразмерный полипептид CD79b). Такими вариантами полипептида CD79b являются, например, полипептиды CD79b, в которых один или несколько аминокислотных остатков добавлены или deletированы у N- или C-конца полноразмерной нативной аминокислотной последовательности. Обычно вариант полипептида CD79b имеет

15 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% и, альтернативно, по меньшей мере примерно на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности полноразмерного нативного полипептида CD79b, описанного в настоящей заявке; последовательности полипептида CD79b, не содержащего сигнального

20 пептида, описанного в настоящей заявке; последовательности внеклеточного домена полипептида CD79b, содержащего или не содержащего сигнальный пептид, описанный в настоящей заявке; или последовательности любого другого конкретно определенного фрагмента полноразмерного полипептида CD79b, описанного в настоящей заявке. Обычно варианты полипептида CD79b имеют длину по меньшей мере примерно 10

25 аминокислот или, альтернативно, по меньшей мере примерно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 аминокислот или более. Варианты полипептидов CD79b имеют, но необязательно, не более чем одну

30 консервативную замену и, альтернативно, не более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 консервативных аминокислотных замен по сравнению с нативной последовательностью полипептида CD79b.

«Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» пептидов или полипептидов, то есть, последовательностей полипептида CD79b, идентифицированного

35 в настоящей заявке, определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности, то есть последовательности полипептида CD79b, после выравнивания этих последовательностей и введения в них “пробелов”, если это необходимо, для достижения максимального

40 процента идентичности последовательностей, причем какие-либо консервативные замены не рассматриваются как часть идентичных последовательностей. Выравнивание, осуществляемое в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей, может быть проведено различными методами, известными

специалистам, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или MegAlign (DNASTAR). Специалист

45 в данной области может самостоятельно определить соответствующие параметры выравнивания, включая использование любых алгоритмов, необходимых для достижения оптимального выравнивания по всей длине сравниваемых

последовательностей. Однако, в целях настоящего изобретения, % идентичности аминокислотных последовательностей вычисляют с применением компьютерной программы ALIGN-2, используемой для сравнения последовательностей, где полный исходный код программы ALIGN-2 представлен ниже в таблице 1. Компьютерная программа ALIGN-2, используемая для сравнения последовательностей, была разработана фирмой Genentech, Inc. и указанный исходный код, представленный ниже в таблице 1, был зарегистрирован в документации для пользователей в Ведомстве по копирайту США, Вашингтон, D.C., 20559, под регистрационным номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной программой, поставляемой фирмой Genentech, Inc., South San Francisco, California, либо она может быть составлена на основе исходного кода, представленного ниже в таблице 1. Программа ALIGN-2 должна быть составлена для применения в операционной системе UNIX, а предпочтительно в цифровой системе UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей были установлены в программе ALIGN-2 и не изменялись.

В случае, когда для сравнения аминокислотных последовательностей используется программа ALIGN-2, то % идентичности данной аминокислотной последовательности А с данной аминокислотной последовательностью В (которая альтернативно может быть названа данной аминокислотной последовательностью А, имеющей или составляющей определенный % идентичности с данной аминокислотной последовательностью В) вычисляют следующим образом:

$$100 \cdot X/Y,$$

где X представляет собой число аминокислотных остатков, которые были оценены как полностью соответствующие при выравнивании последовательностей с использованием программы ALIGN-2, с помощью которой проводили сравнение последовательностей А и В, и где Y представляет собой полное число аминокислотных остатков в последовательности В. При этом следует отметить, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотной последовательности А с аминокислотной последовательностью В не равен % идентичности аминокислотной последовательности В с аминокислотной последовательностью А.

Термин «вариант полинуклеотида CD79b» или «последовательность нуклеиновой кислоты варианта CD79b» означает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CD79b, а предпочтительно активный полипептид CD79b, определенный в настоящем описании и имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 80% идентична полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерный нативный полипептид CD79b, описанный в настоящей заявке; полноразмерный нативный полипептид CD79b, не содержащий сигнального пептида, описанного в настоящей заявке; внеклеточный домен полипептида CD79b, содержащий или не содержащий сигнальный пептид, описанный в настоящей заявке; или последовательность любого другого фрагмента полноразмерного полипептида CD79b, описанного в настоящей заявке (такого как полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой, которая представляет собой лишь часть полноразмерной последовательности, кодирующей полноразмерный полипептид CD79b). Обычно вариант полинуклеотида CD79b имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 80% и, альтернативно, по меньшей мере примерно на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерный нативный полипептид CD79b, описанный в настоящей

заявке; полноразмерную последовательность нативного полипептида CD79b, не содержащего сигнального пептида, описанного в настоящей заявке; внеклеточный домен полипептида CD79b, содержащего или не содержащего сигнальную последовательность, описанную в настоящей заявке; или последовательность любого другого фрагмента полноразмерного полипептида CD79b, описанного в настоящей заявке. Эти варианты не содержат нативную нуклеотидную последовательность.

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

«Процент (%) идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты», то есть последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей CD79b, идентифицированной в настоящей заявке, определяют как процент нуклеотидов в последовательности-кандидате, которые идентичны нуклеотидам в представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты CD79b, после выравнивания этих последовательностей и введения в них «пробелов», если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание, осуществляемое в целях определения процента идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты, может быть проведено различными методами, известными специалистам, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или MegAlign (DNASTAR). Однако, в целях настоящего изобретения, % идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты вычисляют с применением компьютерной программы ALIGN-2, используемой для сравнения последовательностей, где полный исходный код программы ALIGN-2 представлен ниже в таблице 1. Компьютерная программа ALIGN-2, используемая для сравнения последовательностей, была разработана фирмой Genentech, Inc. и указанный исходный код, представленный ниже в таблице 1, был зарегистрирован в документации для пользователей в Ведомстве по копирайту США, Вашингтон, D.C., 20559, под регистрационным номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной программой, поставляемой фирмой Genentech, Inc., South San Francisco, California, либо она может быть составлена на основе исходного кода, представленного ниже в таблице 1. Программа ALIGN-2 должна быть составлена для применения в операционной системе UNIX, а предпочтительно в цифровой системе UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей были установлены в программе ALIGN-2 и не изменялись.

В случае, когда для сравнения последовательностей нуклеиновой кислоты используется программа ALIGN-2, то % идентичности данной последовательности нуклеиновой кислоты С с данной последовательностью нуклеиновой кислоты D (которая альтернативно может быть названа данной последовательностью нуклеиновой кислоты С, имеющей или составляющей определенный % идентичности с данной последовательностью нуклеиновой кислоты D) вычисляют следующим образом:

100•W/Z,

где W представляет собой число нуклеотидов, которые были оценены как полностью идентичные при выравнивании последовательностей с использованием программы ALIGN-2, с помощью которой проводили сравнение последовательностей C и D, и где Z представляет собой полное число нуклеотидов в последовательности D. При этом следует отметить, что если длина последовательности нуклеиновой кислоты C не равна длине последовательности нуклеиновой кислоты D, то % идентичности последовательности нуклеиновой кислоты C с последовательностью нуклеиновой кислоты D не равен % идентичности нуклеиновой кислоты C с последовательностью нуклеиновой кислоты D. Если это не оговорено особо, все используемые здесь величины % идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты получают, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

В других вариантах изобретения полинуклеотидными вариантами CD79b являются молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид CD79b и которые обладают способностью гибридизоваться предпочтительно в жестких условиях гибридизации и промывки, с нуклеотидными последовательностями, кодирующими описанный здесь полноразмерный полипептид CD79b. Вариантами полипептида CD79b могут быть полипептиды, кодируемые полинуклеотидным вариантом CD79b.

Термин «полноразмерная кодирующая область», если он относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид CD79b, означает нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный полипептид CD79b согласно изобретению (который часто локализуется между стар- и стоп-кодонами, включительно, как показано в прилагаемом графическом материале). Термин «полноразмерная кодирующая область», если он относится к нуклеиновой кислоте, депонированной в АТСС, означает часть кДНК, кодирующую полипептид CD79b и встроенную в вектор, депонированный в АТСС (который часто локализуется между стар- и стоп-кодонами, включительно, как показано в прилагаемом графическом материале (где стар- и стоп-кодоны показаны жирным шрифтом и подчеркнуты)).

Термин «выделенный», если он относится к различным описанным здесь полипептидам CD79b, означает полипептид, который был идентифицирован и выделен и/или очищен от компонентов его природного окружения. Контаминирующими компонентами его природного окружения являются материалы, негативно влияющие на терапевтическую эффективность данного полипептида, и такими компонентами могут быть ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах изобретения указанный полипептид может быть очищен (1) до степени, достаточной для введения по меньшей мере 15 остатков у N-концевой или внутренней части аминокислотной последовательности, с использованием секвенатора, снабженного центрифужным сосудом, или (2) до гомогенности, что может быть подтверждено с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих или в невосстанавливающих условиях с окрашиванием кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Термин «выделенный полипептид» включает полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, если отсутствует по меньшей мере один компонент этого полипептида CD79b, присутствующий в его природном окружении. Однако обычно выделенный полипептид может быть получен по меньшей мере в одной стадии очистки.

«Выделенная» нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CD79b, или другая нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая была идентифицирована и отделена по меньшей мере

от одной примесной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциируется в природном источнике нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, имеет форму или структуру, отличающиеся от формы или структуры природной молекулы.

5 Следовательно, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид, отличаются от конкретной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид и присутствующей в природных клетках. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, включает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид и содержащиеся в клетках, которые обычно экспрессируют
10 полипептид, где, например, молекула нуклеиновой кислоты присутствует в хромосоме в положении, отличающемся от положения этой нуклеиновой кислоты в природных клетках.

Термин «регуляторные последовательности» означает последовательности ДНК, необходимые для экспрессии функционально присоединенной кодирующей
15 последовательности в конкретном организме-хозяине. Регуляторными последовательностями, подходящими для прокариотов, являются, например, промотор, необязательно операторная последовательность и сайт связывания с рибосомой. Эукариотические клетки, как известно, используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

20 Нуклеиновая кислота является «функционально присоединенной», если она находится в функциональной взаимосвязи с другой молекулой нуклеиновой кислоты. Так, например, ДНК для пре-последовательности или секреторной лидерной последовательности является функционально присоединенной к ДНК полипептида, если она экспрессируется как пре-белок, который участвует в секреции полипептида;
25 промотор или энхансер функционально присоединены к кодирующей последовательности, если они влияют на транскрипцию данной последовательности; а сайт связывания с рибосомой функционально присоединен к кодирующей последовательности, если он расположен в положении, благоприятствующем трансляции. Вообще говоря, термин «функционально присоединенный» означает, что
30 последовательности ДНК, связанные друг с другом, являются смежными, а в случае секреторной лидерной последовательности, они являются смежными и расположены в одной рамке считывания. Однако энхансеры необязательно должны быть смежными. Связывание осуществляется посредством лигирования в подходящих рестрикционных сайтах. Если такие сайты отсутствуют, то такие синтетические олигонуклеотидные
35 адаптеры или линкеры используются в соответствии с общепринятой практикой.

«Жесткость условий реакции гибридизации» может быть легко определена средним специалистом в данной области, и обычно она вычисляется эмпирически в зависимости от длины зонда, температуры промывки и концентрации соли. В основном, чем длиннее зонды, тем выше должна быть температура гибридизации, и чем короче зонды, тем
40 ниже должна быть температура. Гибридизация обычно зависит от способности денатурированной ДНК к повторному отжигу, если комплементарные цепи присутствуют в среде, температура которой ниже их температуры плавления. Чем выше степень желаемой гомологии между зондом и гибридизуемой последовательностью, тем выше должна быть относительная температура. Из этого следует, что более высокие
45 относительные температуры создают более жесткие условия реакции, а более низкие температуры создают менее жесткие условия реакции. Более подробное описание и объяснение условий жесткости реакций гибридизации можно найти в руководстве Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

«Условия жесткости» или «условия высокой жесткости», определенные в настоящей заявке, могут быть установлены как условия, которые включают (1) промывку при низкой ионной силе и высокой температуре, например, промывку 0,015 М хлоридом натрия/0,0015 М цитратом натрия/0,1 % додецилсульфатом натрия при 50°C; (2) использование в процессе гибридизации денатурирующего агента, такого как формамид, например, 50% (об./об.) формамид с 0,1 % альбумином бычьей сыворотки/0,1 % фикоλλα/0,1 % поливинилпирролидона/50 мМ натрийфосфатным буфером, pH 6,5, с 750 мМ хлорида натрия, 75 мМ цитрата натрия при 42°C; или (3) гибридизацию в течение ночи в растворе, содержащем 50% формамид, 5×SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрата натрия), 50 мМ фосфата натрия (pH 6,8), 0,1 % пиродифосфата натрия, 5× раствора Денхардта, обработанную ультразвуком ДНК спермы лосося (50 мкг/мл), 0,1 % ДСН и 10% сульфат декстрана при 42°C с 10-минутной промывкой при 42°C в 0,2×SSC (хлорид натрия/цитрат натрия), с последующей 10-минутной промывкой в условиях высокой жесткости, состоящей из 0,1×SSC, содержащего EDTA при 55°C.

«Условия умеренной жесткости» могут быть определены, как описано в руководстве Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, и включают использование менее жестких условий промывки и гибридизации (таких как, например, температура, ионная сила и % ДСН), чем условия, описанные выше. Примером условий умеренной жесткости является инкубирование в течение ночи при 37°C в растворе, содержащем 20% формамид, 5×SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ тринатрийцитрата), 50 мМ фосфата натрия (pH 7,6), 5× раствор Денхардта, 10% сульфат декстрана и 20 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося, с последующей промывкой фильтров в 1×SSC примерно при 37-50°C. Если необходимо адаптировать данные условия к соответствующим параметрам, таким как длина зонда и т.п., то температура, ионная сила и т.п. могут быть скорректированы способами, известными специалистам.

Используемый здесь термин «меченный эпитопом» означает химерный полипептид, содержащий полипептид CD79b или анти-CD79b антитело, присоединенное к «полипептиду-метке». Полипептид-метка должна иметь определенное число остатков, достаточное для создания эпитопа, против которого может быть направлено данное антитело, и должна быть достаточно короткой, то есть такой, чтобы она не влияла на активность полипептида, к которому она присоединена. Кроме того, предпочтительно, чтобы такой полипептид-метка был достаточно уникальный, то есть такой, чтобы антитело не обладало значительной перекрестной реактивностью с другими эпитопами. Подходящие полипептиды-метки обычно имеют по меньшей мере шесть аминокислотных остатков, а в основном примерно 8-50 аминокислотных остатков (предпочтительно примерно 10-20 аминокислотных остатков).

Используемые здесь термины «активный» или «активность» относятся к форме(ам) полипептида CD79b, который сохраняет биологическую и/или иммунологическую активность природного или нативного CD79b, где термин «биологическая активность» означает биологическую функцию (ингибирующую или стимулирующую), сообщаемую нативным или природным CD79b, за исключением способности индуцировать продуцирование антитела против антигенного эпитопа, находящегося на нативном или природном CD79b, а термин «иммунологическая активность» означает способность индуцировать продуцирование антитела против антигенного эпитопа, находящегося на нативном или природном CD79b.

Термин «антагонист» используется здесь в самом широком смысле и включает любую молекулу, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует

биологическую активность нативного полипептида CD79b. Аналогичным образом, термин «агонист» используется здесь в самом широком смысле и включает любую молекулу, которая имитирует биологическую активность нативного полипептида CD79b. Подходящими молекулами агонистов или антагонистов, в частности, являются антитела-агонисты или антагонисты или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотных последовательностей нативных полипептидов, пептидов, антисмысловых олигонуклеотидов, небольших органических молекул CD79b и т.п. Методы идентификации агонистов или антагонистов полипептида CD79b могут включать контактирование полипептида CD79b с молекулой-агонистом или антагонистом, используемой в качестве кандидата, и определение детектируемого изменения одной или нескольких биологических активностей, обычно ассоциированных с полипептидом CD79b.

Термин «очищенный» относится к молекуле, присутствующей в образце в концентрации по меньшей мере 95 масс.% или по меньшей мере 98 масс.% образца, в котором она содержится.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, отделенную по меньшей мере от одной другой молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциируется, например, в природном окружении. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты также включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно экспрессируют данную молекулу нуклеиновой кислоты, но при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в положении хромосомы, отличающемся от ее природного положения в хромосоме.

Используемый здесь термин “вектор” означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить другую нуклеиновую кислоту, к которой она присоединена. Одним типом векторов является “плазмида”, представляющая собой кольцевую двухцепочечную ДНК-петлю, с которой могут быть лигированы дополнительные ДНК-сегменты. Другим типом вектора является фаговый вектор. Еще одним типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные ДНК-сегменты могут быть лигированы с вирусным геномом. Некоторые векторы способны автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую они были введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный ориджин репликации, и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после их введения в указанную клетку-хозяина, в результате чего они могут реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны регулировать экспрессию генов, к которым они были функционально присоединены. Такие векторы называются здесь “рекомбинантными экспрессионными векторами” (или просто “рекомбинантными векторами”). В общих чертах, экспрессионные векторы, обычно используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании термины “плазмида” и “вектор” могут быть взаимозаменяемыми, поскольку плазмида является наиболее распространенной формой вектора.

Используемые здесь термины “полинуклеотид” или “нуклеиновая кислота” являются взаимозаменяемыми и означают полимеры любой длины, состоящие из нуклеотидов, и такими полимерами являются ДНК и РНК. Нуклеотидами могут быть дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер посредством ДНК- или РНК-полимеразы, либо посредством реакции синтеза.

Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если это необходимо, то модификация нуклеотидной структуры может быть осуществлена до или после сборки полимера. Нуклеотидные последовательности могут прерываться ненуклеотидными компонентами.

5 Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после синтеза, например, путем его конъюгирования с меткой. Модификациями других типов являются, например, “кэпы”; замена одного или нескольких природных нуклеотидов их аналогами; межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации путем введения незаряженных связей (например, метилфосфонатов, фосфотриэфиров, фосфоамидатов, 10 карбаматов и т.п.) и заряженных связей (например, фосфортиоатов, фосфордитиоатов и т.п.); модификации, содержащие боковые группы, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.п.); модификации, содержащие интеркалирующие агенты (например, акридин, псорален и т.п.); модификации, содержащие хелатообразующие агенты (например, металлы, 15 радиоактивные металлы, бор, металлы-окислители и т.п.); модификации, содержащие алкилирующие агенты; модификации, содержащие модифицированные связи (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.п.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любые гидроксильные группы, обычно присутствующие в сахарах, могут быть заменены, например, фосфонатными группами 20 и фосфатными группами; защищены стандартными защитными группами; или активированы с образованием дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами; либо они могут быть конъюгированы с твердыми или полутвердыми носителями. 5'- и 3'-концевые ОН могут быть фосфорилированы или замещены аминами или органическими “кэпирующими” группами, состоящими из 1-20 атомов углерода. 25 Другие гидроксилы могут быть также дериватизированы стандартными защитными группами. Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные формы сахаров, таких как рибоза или дезоксирибоза, известных специалистам, включая, например, 2'-О-метилрибозу, 2'-О-аллилрибозу; 2'-фтор- или 2'-азидорибозу; карбоциклические аналоги сахаров; альфа-аномерные сахара; эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилоза 30 или ликсоза; сахар пиранозу, сахар фуранозу; седогептулозу; ациклические аналоги и неосновные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными линкерными группами. Такими альтернативными линкерными группами являются, но не ограничиваются ими, варианты, в которых фосфат заменен P(O)S (“тиоат”), P(S)S (“дитиоат”), (O)NR₂ 35 (“амидат”), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ (“формацеталь”), где каждый из R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (C₁₋₂₀), необязательно содержащий эфирную связь (-O-), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. 40 Вышеприведенное описание относится ко всем используемым здесь полинуклеотидам, включая РНК и ДНК.

Используемый здесь термин “олигонуклеотид”, в общих чертах, означает короткие, в основном одноцепочечные, обычно синтетические полинуклеотиды, длина которых составляет, главным образом, но необязательно, менее чем примерно 200 нуклеотидов. Термины “олигонуклеотид” и “полинуклеотид” не являются взаимоисключающими. 45 Вышеприведенное описание полинуклеотидов может в равной степени и полностью относиться к олигонуклеотидам.

Используемые здесь термины “рак” и “раковый” относятся к физиологическому

состоянию млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примерами раковых заболеваний являются, но не ограничиваются ими, рак гемопоэтической системы или рак крови, такой как лимфома, лейкоз, миелома или лимфоидные злокачественные заболевания, а также рак селезенки, рак лимфоузлов, карцинома, бластома и саркома. Более конкретными примерами таких раковых заболеваний являются В-клеточный рак, включая, например, высокозлокачественную, среднелзлокачественную и низкокзлокачественную лимфому (включая В-клеточные лимфомы, такие как, например, В-клеточная лимфома лимфоидной ткани слизистой, и неходжкинская лимфома (НХЛ), лимфома клеток коры головного мозга, лимфома Беркитта, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лимфома маргинальной зоны, диффузная крупноклеточная лимфома, фолликулярная лимфома, ходжкинская лимфома и Т-клеточные лимфомы) и лейкоз (включая вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), такой как В-клеточный лейкоз (CD5⁺-В-лимфоциты), миелоидный лейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоидный лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и миелодисплазия) и другие гематологические и/или В-клеточные или Т-клеточные раковые опухоли. В настоящее изобретение также входят раковые заболевания других гемопоэтических клеток, включая полиморфоядерные лейкоциты, такие как базофилы, эозинофилы, нейтрофилы и моноциты, дендритные клетки, тромбоциты, эритроциты и природные клетки-киллеры. В настоящее изобретение также входят раковые В-клеточные пролиферативные расстройства, выбранные из нижеследующих заболеваний, таких как лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная НХЛ, рецидивирующая агрессивная НХЛ, рецидивирующая бессимптомная НХЛ, не поддающаяся лечению НХЛ, не поддающаяся лечению бессимптомная НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома клеток коры головного мозга. Участками образования В-клеточного рака являются следующие участки, например, В-клеточная лимфома маргинальной зоны развивается в В-клетках памяти в маргинальной зоне, фолликулярная лимфома и диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома развивается в центроцитах в светлой зоне зародышевых центров; хронический лимфоцитарный лейкоз и мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз развивается в клетках В1 (CD5⁺); лимфома клеток коры головного мозга развивается в «необученных» В-клетках в зоне коры головного мозга, а лимфома Беркитта развивается в центробластах в темной зоне зародышевых центров. Тканями, которые включают гемопоэтические клетки и которые называются здесь «тканями гемопоэтических клеток», являются тимус и костный мозг, а также периферические лимфоидные ткани, такие как селезенка и лимфоузлы; лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистой, такие как лимфоидные ткани кишечника, миндалины, Пейеровы бляшки и аппендикс, и лимфоидные ткани, ассоциированные с другими участками слизистой, например, выстилка бронхов. Другими конкретными примерами таких раковых заболеваний являются плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарцинома легких, плоскоклеточная карцинома легких, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиома, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой и ободочной кишки, карцинома эндометрия или матки, карцинома слюнных желез, рак почек, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карцинома печени, лейкоз и другие лимфопролиферативные расстройства, и различные типы рака головы и шеи.

Используемый здесь термин «В-клеточная злокачественная опухоль» охватывает неходжкинскую лимфому (НХЛ), включая низкозлокачественную/фолликулярную НХЛ, мелкоклеточную лимфоцитарную (МЛ) НХЛ, среднезлокачественную/фолликулярную НХЛ, среднезлокачественную диффузную НХЛ, высокозлокачественную иммунобластную НХЛ, высокозлокачественную лимфобластную НХЛ, высокозлокачественную мелкоклеточную недифференцированную НХЛ, генерализованную НХЛ, лимфому клеток коры головного мозга, лимфому, ассоциированную со СПИД, и макроглобулинемию Вальденстрема; неходжкинскую лимфому (НХЛ), лимфоцитарную преобладающую болезнь Ходжкина (ЛПБХ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), бессимптомную НХЛ, включая рецидивирующую бессимптомную НХЛ и бессимптомную НХЛ, не поддающуюся лечению ритуксимабом; лейкоз, включая острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), ретикулоэндотелиоз, хронический миелобластный лейкоз; лимфому клеток коры головного мозга и другие гематологические злокачественные опухоли. Такие злокачественные заболевания могут быть подвергнуты лечению антителами против маркеров В-клеточной поверхности, таких как CD79b. Такие заболевания рассматриваются здесь как заболевания, которые могут быть подвергнуты лечению путем введения антитела против маркера В-клеточной поверхности, такого как CD79b, где указанное лечение включает введение неконъюгированного («оголенного») антитела или антитела, конъюгированного с цитотоксическим средством, описанным в настоящей заявке. Такие заболевания также рассматриваются здесь как заболевания, которые могут быть подвергнуты лечению методами комбинированной терапии, включающей введение анти-CD79b антитела или конъюгата «анти-CD79b антитело-лекарственное средство» согласно изобретению в комбинации с введением другого антитела или другого конъюгата «антитело-лекарственное средство», или другого цитотоксического средства, с лучевой терапией или другим курсом терапии, проводимым одновременно или последовательно. В репрезентативном способе лечения согласно изобретению, анти-CD79b антитело согласно изобретению вводят в комбинации с анти-CD20 антителом, иммуноглобулином или его CD20-связывающим фрагментом, и такое лечение может быть проведено одновременно или последовательно. Анти-CD20 антителом может быть «оголенное» антитело или конъюгат «антитело-лекарственное средство». В варианте комбинированной терапии анти-CD79b антителом является антитело согласно изобретению, а анти-CD20 антителом является Rituxan® (ритуксимаб).

Используемый здесь термин «неходжкинская лимфома» или «НХЛ» означает рак лимфатической системы, за исключением лимфомы Ходжкина. В общих чертах, лимфомы Ходжкина и неходжкинские лимфомы могут отличаться тем, что в лимфоме Ходжкина присутствуют клетки Рида-Штернберга, а в неходжкинской лимфоме эти клетки отсутствуют. Примерами неходжкинских лимфом, охватываемых используемым здесь термином, являются все лимфомы, которые могут быть идентифицированы специалистом в данной области (например, онкологом или патологом) в соответствии с известными схемами классификации, такими как Пересмотренная Евро-Американская схема классификации лимфом (REAL), описанная в «Цветном атласе клинической гематологии» (3-е издание) (Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.)(Harcourt Publishers Ltd., 2000). См., в частности, списки, представленные на фиг.11.57, 11.58 и 11.59. Более конкретными примерами таких лимфом являются, но не ограничиваются ими, рецидивирующая или не поддающаяся

лечению НХЛ; пограничная низкоклеточная НХЛ первой линии; НХЛ на стадии III/IV; НХЛ, резистентная к химиотерапии; лимфобластный лейкоз и/или лимфома, содержащая В-клетки-предшественники; мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома; В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз и/или пролимфоцитарный лейкоз и/или мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома; В-клеточная пролимфоцитарная лимфома; иммуноцитома и/или лимфоплазматическая лимфома; лимфоплазматическая лимфома; В-клеточная лимфома маргинальной зоны; лимфома маргинальной зоны селезенки; лимфома экстранодальной маргинальной зоны - MALT; нодальная лимфома маргинальной зоны; ретикулоэндотелиоз; плазмацитома и/или плазматическая миелома; низкоклеточная/фолликулярная лимфома; среднелкоклеточная/фолликулярная НХЛ; лимфома коры головного мозга; фолликулярно-центроцитарная лимфома (фолликулярная); среднелкоклеточная диффузная НХЛ; диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома; агрессивная НХЛ (включая агрессивную пограничную и агрессивную рецидивирующую НХЛ); НХЛ, рецидивирующая после трансплантации аутологичных стволовых клеток, или НХЛ, резистентная к такой трансплантации; первичная медиастинальная крупноклеточная В-клеточная лимфома; первичная эффузионная лимфома; высококлеточная иммунобластная НХЛ; высококлеточная лимфобластная НХЛ; высококлеточная мелкоклеточная недифференцированная НХЛ; генерализованная НХЛ; лимфома Беркитта; гранулоцитарный крупноклеточный лейкоз клеток-предшественников (периферических); грибовидный микоз и/или синдром Сезари; лимфома кожи (кожная лимфома); анапластическая крупноклеточная лимфома и ангиоцентрическая лимфома.

Термин «расстройство» означает любое состояние, которое поддается лечению веществом/молекулой или способом согласно изобретению. Такими расстройствами являются хронические и острые расстройства или заболевания, включая патологические состояния, которые создают у данного млекопитающего предрасположенность к рассматриваемому расстройству. Неограничивающими примерами описанных здесь расстройств, подвергаемых лечению, являются раковые заболевания, такие как злокачественные и доброкачественные опухоли; не являющиеся лейкозом, и лимфоидные злокачественные опухоли; поражения нейронов, глиальных клеток, астроцитов, гипоталамуса и другие поражения эндокринной системы, макрофагов, эпителия, стромы и бластоцеля; воспалительные и иммунные расстройства и другие расстройства, ассоциированные с ангиогенезом. Кроме того, такими расстройствами также являются раковые заболевания, такие как В-клеточные пролиферативные расстройства и/или В-клеточные опухоли, например, лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная НХЛ, рецидивирующая агрессивная НХЛ, рецидивирующая бессимптомная НХЛ, не поддающаяся лечению НХЛ, не поддающаяся лечению бессимптомная НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома клеток коры головного мозга.

Термины «клеточно-пролиферативное расстройство» и «пролиферативное расстройство» означают расстройства, ассоциированные с определенной степенью аномальной пролиферации клеток. В одном из вариантов изобретения указанным клеточно-пролиферативным расстройством является рак.

Используемый здесь термин «опухоль» означает все неопластические клетки, подвергающиеся росту и пролиферации, независимо от того, являются ли они доброкачественными или злокачественными, и все предраковые и раковые клетки и ткани.

Используемый здесь термин “аутоиммунное заболевание” означает заболевание или расстройство, вызываемое реакцией, продуцируемой организмом против своих собственных тканей или органов, либо ко-сегрегацию или манифестацию этих расстройств или ассоциированное с ними состояние. При многих таких аутоиммунных и воспалительных расстройствах может присутствовать определенное число клинических лабораторных маркеров, включая, но не ограничиваясь ими, гипергаммаглобулинемию, высокие уровни аутоантител, осаждение комплекса «антиген-антитело» в тканях, благоприятный эффект лечения кортикостероидами или иммунодепрессантами и агрегаты лимфоидных клеток в пораженных тканях. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией относительно В-клеточного аутоиммунного заболевания, можно сказать, что при человеческих аутоиммунных заболеваниях В-клетки демонстрируют свое патогенное действие по множеству механизмов, включая продуцирование аутоантител, образование иммунных комплексов, активацию дендритных клеток и Т-клеток, синтез цитокинов, прямое высвобождение хемокинов и появление очага эктопического неоплазматического роста. Каждый из этих механизмов в той или иной степени может участвовать в развитии аутоиммунных заболеваний.

«Аутоиммунным заболеванием» может быть орган-специфическое заболевание (то есть иммунный ответ конкретно направлен на систему органов, такую как эндокринная система, гемопоэтическая система, кожа, сердечно-легочная система, желудочно-кишечный тракт и печень, а также почечная система, щитовидная железа, уши, нервно-мышечная система, центральная нервная система и т.п.) или системное заболевание, которое может поражать системы многих органов (например, системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит, полимиозит и т.п.). Предпочтительно такими заболеваниями являются аутоиммунные ревматологические расстройства (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Сьегрена, склеродермия, волчанка, такая как СКВ и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, синдром антифосфолипидных антител и псориатический артрит), аутоиммунные заболевания желудочно-кишечного тракта и болезни печени (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютенная болезнь), васкулит (такой как, например, ANCA-негативный васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Черга-Штраусса, гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит), аутоиммунные нервные расстройства (такие как, например, рассеянный склероз, синдром пляшущих пальцев, тяжелая миастения, нейромиелиит зрительного нерва, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунная полиневропатия), болезни почек (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и болезнь Бергера), аутоиммунные кожные болезни (такие как, например, псориаз, крапивница, сыпь, вульгарная пузырчатка, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические расстройства (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромбоцитарная тромбоцитопеническая пурпура, пурпура, возникающая после переливания крови, и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания слуховых путей (такие как, например, заболевание внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, заболевание, ассоциированное с трансплантацией органов, и аутоиммунные заболевания эндокринной системы (такие как, например, аутоиммунные заболевания, ассоциированные с диабетом, такие как инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь

Грейвса и тиреоидит)). Из указанных заболеваний более предпочтительными являются, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанка, рассеянный склероз, синдром Сьегрена, болезнь Грейвса, ИЗСД, пернициозная анемия, тиреоидит и гломерулонефрит.

- 5 Конкретными примерами других аутоиммунных заболеваний, указанных в настоящей заявке, которые, в некоторых случаях, охватывают перечисленные выше заболевания, являются, но не ограничиваются ими, артрит (острый и хронический артрит, ревматоидный артрит, включая ювенильный ревматоидный артрит и его стадии, такие как ревматоидный синовит, подагра или подагрический артрит, острый иммунный
- 10 артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, артрит, индуцированный коллагеном типа II, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, артрит позвонков, остеоартрит, проградияльный хронический артрит, деформирующий артрит, хронический первичный полиартрит, реактивный артрит, климактерический артрит,
- 15 артрит, вызываемый истощением эстрогена и анкилозирующий спондилит/ревматоидный спондилит), аутоиммунное лимфопролиферативное заболевание, воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как бляшковый псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей; атопии, включая атопические заболевания, такие как сенная лихорадка и синдром Джоба; дерматит,
- 20 включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, эксфолиативный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, крапивницу, герпетиформный дерматит, монетовидный дерматит, себорейный дерматит, неспецифический дерматит, первичный простой контактный дерматит и атопический дерматит; сцепленный с X-хромосомой гипер-IgM-синдром, аллергические
- 25 внутриглазные воспалительные заболевания, крапивница, такая как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, миозит, полимиозит/дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, склеродермию (включая системную склеродермию), склероз, такой как системный склероз, рассеянный
- 30 склероз (РС), такой как РС, сопровождающийся нарушением функции спинного мозга и органов зрения, первичный прогрессирующий РС (ППРС) и рецидивирующий-ремитирующий РС (РРРС), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, рассеянный (множественный) склероз, атаксический склероз, нейромиелит зрительного нерва (НЗН), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК)
- 35 (например, болезнь Крона, аутоиммунные желудочно-кишечные расстройства, воспаления желудочно-кишечного тракта, колиты, такие как язвенный колит, неспецифический язвенный колит, микроскопический колит, коллагенозный колит, полипозный колит, некрозирующий энтероколит и трансмуральный колит, и аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника); воспаление кишечника,
- 40 гангренозная пиодермия, узелковая эритема, первичный склерозирующий холангит, респираторный дистресс-синдром, включая респираторный дистресс-синдром взрослых (РДСВ) или острый респираторный дистресс-синдром, менингит, воспаление всего увеального тракта или его части, ирит, хороидит, аутоиммунное гематологическое расстройство, реакция «трансплантат против хозяина», ангиоэдема, такая как
- 45 наследственная ангиоэдема, поражение черепного нерва, как при менингите, герпес беременных, пемфигоид беременных, зуд в области мошонки, аутоиммунное преждевременное угасание функции яичника, внезапная потеря слуха, вызываемая аутоиммунным состоянием, IgE-опосредуемые заболевания, такие как анафилаксия и

аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и энцефалит с поражением конечностей и/или ствола головного мозга, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантигенный увеит, задний увеит или аутоиммунный увеит, гломерулонефрит (ГН) с нефротическим синдромом или без нефротического синдрома, такой как хронический или острый гломерулонефрит, такой как первичный ГН, иммуноопосредованный ГН, мембранозный ГН (мембранозная нефропатия), идиопатический мембранозный ГН или идиопатическая мембранозная нефропатия, мембранозный или мембранозно-пролиферативный ГН (МПГН), включая

10 гломерулонефрит типа I и типа II, и быстро прогрессирующий ГН (БПГН), пролиферативный нефрит, аутоиммунная плюригландулярная эндокринная недостаточность, баланит, включая плазматочный огибающий баланит, баланопостит, кольцевая центробежная эритема, пепельный дерматоз, многоформная эритема, кольцевидная гранулема, блестящий лишай, склеротический атрофический

15 лишай, простой хронический лишай, шиповидный лишай, плоский лишай, ламеллярный ихтиоз, эпидермолитический гиперкератоз, предраковый кератоз, гангренозная пиодермия, аллергические состояния и ответы, пищевые аллергии, аллергии на лекарственные средства, аллергии на насекомых, редкие аллергические расстройства, такие как мастоцитоз, аллергические реакции, экзема, включая аллергическую или

20 атопическую экзему, астеатопическую экзему, дисгидротическую экзему и пузырчатую ладонно-подошвенную экзему; астма, такая как бронхиальная астма и аутоиммунная астма; состояния, вызываемые инфильтрацией Т-клеток и хронические воспалительные ответы, иммунные реакции против чужеродных антигенов, таких как антигены группы крови А-В-О плода, продуцируемые при беременности, хроническое воспалительное

25 заболевание легких, аутоиммунный миокардит, недостаточная адгезия лейкоцитов; волчанка, включая волчаночный нефрит, волчаночный энцефалит, детскую волчанку, непочечную волчанку, внепочечную волчанку, дискоидную волчанку, дискоидную красную волчанку и волчаночную алопецию; системная красная волчанка (СКВ), такая как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, волчаночный синдром новорожденных

30 (ВСР) и диссеминированная красная волчанка; юношеский сахарный диабет (типа I), включая детский инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), сахарный диабет взрослых (диабет типа II), аутоиммунный диабет, идиопатический несахарный диабет, диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, диабетический колит, диабетическое поражение крупных артерий; иммунные реакции, ассоциированные с

35 острой гиперчувствительностью замедленного типа, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, агранулоцитоз; васкулитиды (включая васкулит крупных кровеносных сосудов, такой как ревматическая полимиалгия и гигантоклеточный артериит (Такаясу), васкулит средних кровеносных сосудов, такой как болезнь Кавазаки и узелковый

40 полиартериит/узелковый периартериит, иммуноваскулит, васкулит ЦНС, кожный васкулит, аллергический васкулит, некрозирующий васкулит, такой как фибриноидный некрозирующий васкулит и системный некрозирующий васкулит, ANCA-негативный васкулит, ANCA-ассоциированный васкулит, такой как синдром Черга-Штраусса (СЧШ), гранулематоз Вегенера, и микроскопический полиангиит), височный артериит,

45 апластическая анемия, аутоиммунная апластическая анемия, позитивная анемия Кумбса, анемия Даймонда-Блекфана, гемолитическая анемия или иммунная гемолитическая анемия, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА), злокачественная анемия (пернициозная анемия), болезнь Аддисона, истинная эритроцитарная анемия

или аплазия (ИЭА), дефицит фактора VIII, гемофилия А, аутоиммунная нейтропения, цитопения, такая как панцитопения, лейкопения, заболевания, приводящие к диapedезу лейкоцитов, воспалительные расстройства ЦНС, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром поражения многих органов, такой как вторичный синдром, ассоциированный с сепсисом, травмой или геморрагией; заболевания, опосредуемые образованием комплекса “антиген-антитело”, болезнь гломерулярных базальных мембран, катализируемая реакцией антитело-антиген, антифосфолипидный синдром, нейрит двигательного нерва, аллергический нейрит, болезнь/синдром Бехчета, синдром Каслмана, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Сьегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид или пузырчатка, такой как буллезный пемфигоид, рубцующийся пемфигоид (слизистой оболочки), кожный пемфигоид, пузырчатка вульгарная, паранеопластическая пузырчатка, пузырчатка листовидная, пемфигоид слизистых оболочек-мембранозный пемфигоид и пузырчатка эритематозная, приобретенный буллезный эпидермолиз, воспаление глаз, предпочтительно аллергическое воспаление глаз, такое как аллергический конъюнктивит, буллезное заболевание, ассоциированное с линейным IgA, воспаление конъюнктивы, индуцированное аутоиммунным заболеванием, аутоиммунные полиэндокринопатии, болезнь или синдром Райтера, ожоговая травма, вызванная аутоиммунным заболеванием, преэклампсия, болезнь иммунных комплексов, такая как нефрит иммунных комплексов, антитело-опосредуемый нефрит, нейровоспалительные расстройства, полиневропатии, хроническая невропатия, такая как IgM-полиневропатия или IgM-опосредованная невропатия, тромбоцитопения (например, развивающаяся у пациента с инфарктом миокарда), включая тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), посттрансфузионную пурпуру (ПТП), индуцированную гепарином тромбоцитопению, и аутоиммунную или иммуно-опосредованную тромбоцитопению, включая, например, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), включая хроническую или острую ИТП; склерит, такой как идиопатический кератосклерит, эписклерит, аутоиммунное заболевание яичек и яичника, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреозит, гипопаратиреозит, аутоиммунные эндокринные заболевания, включая тиреозит, такой как аутоиммунный тиреозит, болезнь Хашимото, хронический тиреозит (тиреозит Хашимото), или подострый тиреозит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, идиопатический гипотиреозит, болезнь Грейвса, глазная болезнь Грейвса (офтальмопатия или офтальмопатия, ассоциированная с поражением щитовидной железы), плюриглангулярные синдромы, такие как аутоиммунные плюриглангулярные синдромы, например, типа I (или синдромы плюриглангулярной эндокринопатии), паранеопластические синдромы, включая неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Итона-Ламберта, синдром “негнущегося человека”, энцефаломиелит, такой как аллергический энцефаломиелит (или encephalomyelitis allergica) и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), тяжелая миастения, такая как тяжелая миастения, ассоциированная с тимомой, дегенерация мозжечка, невромиотония, опсоклонус или синдром “пляшущих глаз” (СПГ) и невропатия органов чувств, мультифокальная невропатия двигательной системы, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит, хронический гепатит, волчаночный гепатит, гигантоклеточный гепатит, хронический активный гепатит или аутоиммунный хронический активный гепатит, пневмонит, такой как лимфоидный интерстициальный пневмонит (ЛИП), облитерирующий бронхиолит (не передающийся, в отличие от NSIP); синдром Гийена-Барре, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), идиопатическая IgA-нефропатия, линейный

IgA-дерматоз, острый фебрильный нейтрофильный дерматоз, субкорнеальный
 пустулезный дерматоз, преходящий акантолитический дерматоз, цирроз, такой как
 первичный билиарный цирроз и пневмоцирроз, синдром аутоиммунной энтеропатии,
 заболевание кишечника или целиакия, кишечная спру (глутеновая энтеропатия), не
 5 поддающаяся лечению спру, идиопатическая спру, криоглобулинемия, такая как
 смешанная криоглобулинемия, амилотрофический боковой склероз (АБС; болезнь Луи
 Герига), ишемическая болезнь сердца; аутоиммунное заболевание уха, такое как
 аутоиммунное заболевание внутреннего уха (АЗВУ); аутоиммунная потеря слуха;
 полихондрит, такой как не поддающийся лечению или рецидивирующий полихондрит;
 10 легочный альвеолярный протеиноз, кератит, такой как синдром Когана/
 несифилитический интерстициальный кератит, паралич Белла, болезнь/синдром Свита,
 аутоиммунная розацея, боли, ассоциированные с опоясывающим лишаем, амилоидоз,
 нераковый лимфоцитоз, первичный лимфоцитоз, включая моноклональный В-клеточный
 лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммопатию и
 15 моноклональную гаммопатию неясной этиологии, MGUS); периферическая невропатия,
 паранеопластический синдром; “каналопатии”, такие как эпилепсия, мигрень, аритмия,
 мышечные расстройства, глухота, слепота, периодический паралич и “каналопатии”
 ЦНС, аутизм, воспалительная миопатия и очаговый или сегментарный, либо очаговый
 сегментарный гломерулосклероз (ОСГС), эндокринная офтальмопатия, увеоретинит,
 20 хореоретинит, аутоиммунное заболевание печени, фибромиалгия, множественная
 эндокринная недостаточность, синдром Шмидта, аденолит, атрофия желудка,
 пресенильная деменция, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные
 демиелинизирующие заболевания и хроническая воспалительная демиелинизирующая
 полиневропатия, синдром Дресслера, гнездная алопеция, общая алопеция, синдром
 25 CREST (кальциноз, феномен Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и
 телеангиэктазия), аутоиммунное бесплодие у мужчин и женщин, например, вызываемое
 антителами против сперматозоидов, смешанное заболевание соединительных тканей,
 болезнь Чагаса, ревматическая лихорадка, привычный выкидыш, болезнь легких у
 фермеров, многоформная эритема, посткардиотомный синдром, синдром Кушинга,
 30 болезнь легких любителей птиц, аллергический гранулематозный ангиит,
 доброкачественный лимфоцитарный ангиит, синдром Альпорта, альвеолит, такой как
 аллергический альвеолит и фиброзный альвеолит, интерстициальная болезнь легких,
 трансфузионная болезнь, лепра, малярия, паразитарные болезни, такие как лейшманиоз,
 кипаносомоз, шистосомоз, аскариоз, аспергиллез, синдром Сэмптера, синдром Каплана,
 35 лихорадка денге, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, диффузный
 интерстициальный легочный фиброз, интерстициальный легочный фиброз, фиброзный
 медиастинит, легочный фиброз, идиопатический фиброз легких, кистозный фиброз,
 эндофталамит, эритема возвышенная стойкая, эритробластоз плода, эозинофильный
 фасцит, синдром Шулмана, синдром Фелти, фляриоз, циклит, такой как хронический
 40 циклит, гетерохронический циклит, иридоциклит (острый или хронический) или циклит
 Фукса, пурпура Геноха-Шенлейна, инфекция, вызываемая вирусом иммунодефицита
 человека (ВИЧ), тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД), синдром
 приобретенного иммунодефицита (СПИД), инфекции, вызываемые экзавирусом; сепсис
 (системный синдром, ассоциированный с воспалительным ответом)); эндотоксемия;
 45 панкреатит; тироксикоз; инфекции, вызываемые парвовирусом; инфекции, вызываемые
 вирусом коревой краснухи; синдром, развивающийся после вакцинации; наследственная
 инфекция, вызываемая вирусом коревой краснухи; инфекции, вызываемые вирусом
 Эпштейна-Барра; паротит, синдром Эванса, аутоиммунная гонадная недостаточность,

хорея Сиденгама, пост-стрептококковый нефрит, облитерирующий тромбоангиит, тиротоксикоз, сухотка спинного мозга, хориодит, гигантоклеточная полимиалгия, хронический аллергический пневмонит, конъюнктивит, такой как весенний аллергический конъюнктивит, сухой кератоконъюнктивит, эпидермический кератоконъюнктивит, синдром идиопатического нефрита, нефропатия, характеризующаяся минимальными изменениями почечной ткани, доброкачественные наследственные и вызываемые ишемией реперфузионные нарушения, реперфузионные повреждения при трансплантации органов, аутоиммунное заболевание сетчатки, воспаление суставов, бронхит, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей/легких, силикоз, афты, афтозный стоматит, артериосклеротические расстройства (недостаточность цереброваскулярной функции), такие как артериосклеротическая энцефалопатия и артериосклеротическая ретинопатия, аспермиогенез, аутоиммунный гемолиз, болезнь Бека, криоглобулинемия, контрактура Дюпюитрена, факоанафилактическая эндофтальмия, аллергический энтерит, нодозная лепроматозная эритема, идиопатический лицевой паралич, синдром хронической усталости, ревматическая лихорадка, синдром Хаммена-Рича; нейросенсорная потеря слуха, пароксизмальная гемоглобинурия, гипогонадизм, регионарный илеит, лейкопения, инфекционный мононуклеоз, поперечный миелит, первичная идиопатическая микседема, нефроз, симпатическая офтальмия (симпатический офтальмит), офтальмит новорожденных, нейрит зрительного нерва, гранулематозный орхит, панкреатит, острый полирадикулит, гангренозная пиодермия, тиреоидит Кервена, приобретенная атрофия спинного мозга, незлокачественная тимома, лимфофолликулярный тимит, витилиго, синдром токсического шока, отравление пищевыми продуктами, состояния, вызываемые инфильтрацией Т-клеток, недостаточная адгезия лейкоцитов, иммунные ответы, ассоциированные с острой гиперчувствительностью и с гиперчувствительностью замедленного типа, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, заболевания, ассоциированные с диapedезом лейкоцитов, синдром поражения многих органов, заболевания, опосредуемые образованием комплекса "антиген-антитело", болезнь гломерулярных базальных мембран, катализируемая реакцией "антиген-антитело", аутоиммунная полиэндокринопатия, оофорит, первичная микседема, аутоиммунный атрофический гастрит, ревматические заболевания, смешанное заболевание соединительных тканей, нефротический синдром, инсулит, полиэндокринная недостаточность, аутоиммунные плюригландулярные синдромы, включая плюригландулярный синдром типа I, идиопатический гипопаратиреоидит взрослых (ИГВ), кардиомиопатия, такая как застойная (дилатационная) кардиомиопатия, такая как застойная кардиомиопатия, приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ), гемохроматоз, миокардит, нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный или негнойный синусит, острый или хронический синусит; решетчатый синусит, фронтит, верхнечелюстной синусит или сфеноидит; аллергический синусит, эозинофильные расстройства, такие как эозинофилия, легочная инфильтрирующая эозинофилия, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Леффлера, хроническая эозинофильная пневмония, тропическая легочная эозинофилия, бронхопневмонический аспергиллез, аспергиллема или гранулемы, содержащие эозинофилы; анафилаксия, спондилоартропатии, серонегативные спондилоартриты, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, склерит, эписклерит, хронический слизисто-кожный кандидоз, синдром Брутона, преходящая гипогаммоглобулинемия у детей, синдром Вискотта-Алдрича, синдром атаксии-телеангиэктазии, ангиэктазия, аутоиммунные расстройства, ассоциированные с

коллагеновой болезнью, ревматизм, такой как хронический артрит, ревматизм, лимфаденит, реакция на снижение кровяного давления, сосудистая дисфункция, повреждение ткани, сердечно-сосудистая ишемия, гипералгезия, почечная ишемия, ишемия головного мозга и заболевание, сопровождающееся васкуляризацией,

5 аллергические расстройства, ассоциированные с гиперчувствительностью, гломерулонефрит, реперфузионное повреждение, ишемическое реперфузионное повреждение, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, лимфоматозный трахеобронхит, воспалительные дерматозы, дерматозы с компонентами острого воспаления, недостаточность многих органов, буллезные заболевания, некроз

10 коркового вещества почки, острый гнойный менингит или другие воспалительные расстройства центральной нервной системы, воспалительные заболевания глаз и глазницы; синдромы, ассоциированные с трансфузией гранулоцитов; токсичность, индуцированная цитокинами, нарколепсия, острое серозное воспаление, хроническое трудноизлечимое воспаление, пиелит, гиперплазия внутренней оболочки артерии,

15 пептическая язва, вальвулит и эндометриоз. Такие заболевания рассматриваются здесь как заболевания, которые могут быть подвергнуты лечению путем введения антитела, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности, таким как CD79b, и такое лечение включает введение неконъюгированного («оголенного») антитела или антитела, конъюгированного с цитотоксическим средством, описанным в настоящей заявке.

20 Такие заболевания также рассматриваются здесь как заболевания, которые могут быть подвергнуты лечению путем проведения комбинированной терапии, включающей введение анти-CD79b антитела или конъюгата «анти-CD79b антитело-лекарственное средство» согласно изобретению в комбинации с другим антителом или конъюгатом «антитело-лекарственное средство», с другим цитотоксическим средством, а также с

25 лучевой терапией или другим способом лечения, проводимым одновременно или последовательно.

Термины «лечение», «терапия» или «ослабление симптомов» означают терапевтическое лечение и профилактические или превентивные меры, которые направлены на предупреждение или замедление (ослабление) нежелательного

30 физиологического изменения или расстройства у индивидуума. Индивидуумом, нуждающимся в лечении, является индивидуум, у которого уже имеется указанное расстройство, а также индивидуум, у которого имеется предрасположенность к развитию такого расстройства, или индивидуум, который нуждается в превентивных мерах по предупреждению такого расстройства. Лечение рака у индивидуума или

35 млекопитающего, в опухолях которых экспрессируется полипептид CD79b, считается успешным, если после введения терапевтического количества анти-CD79b антител способами согласно изобретению, у пациента наблюдается заметное и/или измеримое снижение числа раковых клеток или их отсутствие; снижение размера опухоли; ингибирование (то есть замедление до некоторой степени, а предпочтительно

40 прекращение) инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая распространение раковых клеток в мягкие ткани и кость; ингибирование (то есть замедление до некоторой степени, а предпочтительно прекращение) метастазирования опухоли; ингибирование, до некоторой степени, роста опухоли; и/или ослабление, до некоторой степени, одного или нескольких симптомов, ассоциированных с конкретным

45 раковым заболеванием; снижение заболеваемости и смертности, и улучшение качества жизни этих индивидуумов. Анти-CD79b антитело, в зависимости от степени его способности предупреждать рост раковых клеток и/или уничтожать уже имеющиеся раковые клетки, может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Ослабление

таких признаков или симптомов может также ощущаться самим пациентом.

Вышеуказанные параметры для оценки эффективности лечения и положительной динамики заболевания могут быть легко определены с помощью рутинных процедур, известных врачу. Что касается лечения рака, то эффективность лечения может быть
 5 оценена, например, путем определения времени, прошедшего до прогрессирования заболевания (TTP), и/или определения скорости ответа (RR). Метастазы могут быть выявлены с помощью анализов на стадии развития опухолей и путем сканирования кости, а также с помощью анализов на уровне кальция и ферментов для определения распространения опухоли в кость. Может быть также проведено сканирование методами
 10 компьютерной томографии (КТ) в целях выявления распространения опухоли в область таза и лимфоузлов. Для выявления метастазов опухоли в легкие и печень, соответственно, может быть сделана рентгенограмма грудной клетки и проведено измерение уровней ферментов в печени известными методами. Другими рутинными методами мониторинга заболевания являются трансректальная ультразвуковая
 15 эхография (ТУЭ) и трансректальная биопсия (ТБ).

Что касается рака мочевого пузыря, который является более четко локализованным раковым заболеванием, то способы определения прогрессирования данного заболевания включают цитологический анализ мочи под цистоскопом, мониторинг присутствия
 20 крови в моче, визуализацию уретериального тракта путем проведения эхографии или внутривенной пиелографии, компьютерной томографии (КТ) и визуализации методом магнитного резонанса (МР). Присутствие периферических метастазов может быть оценено с помощью КТ брюшной полости, по рентгенограмме грудной клетки или радионуклидной визуализации скелета.

«Постоянное» введение, в отличие от однократного введения, означает введение
 25 средства (средств) в непрерывном режиме, что позволяет поддерживать постоянное терапевтическое действие (активность) в течение длительного периода времени. «Периодическое» введение означает введение, которое не является непрерывным, а проводится циклами.

Термин «индивидуум» означает позвоночное. В некоторых вариантах изобретения
 30 указанным позвоночным является млекопитающее. Млекопитающими являются, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственные животные (такие как коровы), животные, участвующие в спортивных состязаниях, животные-компаньоны (такие как кошки, собаки и лошади), приматы, мыши и крысы. В некоторых вариантах изобретения указанным млекопитающим является человек.

«Млекопитающее», которое может быть подвергнуто лечению или ослаблению
 35 симптомов рака, означает любое животное, классифицированное как млекопитающее, включая человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных, животных, содержащихся в зоопарках, животных, участвующих в спортивных состязаниях, или животных-компаньонов, таких как собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади,
 40 овцы, свиньи, козы, кролики и т.п. Предпочтительным млекопитающим является человек.

Термин «введение в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами» включает одновременное (конкурентное) и последовательное введение в
 любом порядке.

Используемый здесь термин «носители» включает фармацевтически приемлемые
 45 носители, эксципиенты или стабилизаторы, являющиеся нетоксичными для клеток, в которые их вводят, или для млекопитающих, которым вводят эти носители, эксципиенты или стабилизаторы в используемых дозах и концентрациях. В большинстве случаев физиологически приемлемым носителем является водный рН-буференный раствор.

Примерами физиологически приемлемых носителей являются буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; полипептид с низкой молекулярной массой (менее чем примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; спирты ряда сахаров, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN®, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS®.

Термин «твердая фаза» или «твердый носитель» означает безводную матрицу, на которую может быть нанесено или к которой может быть присоединено антитело согласно изобретению. Примерами твердых фаз, рассматриваемых в настоящей заявке, являются твердые фазы, полученные частично или полностью из стекла (например, стекла с регулируемым размером пор), полисахаридов (например, агарозы), полиакриламидов, полистирола, поливинилового спирта и силиконов. В некоторых вариантах изобретения, в зависимости от контекста описания, твердая фаза может представлять собой лунку аналитического планшета, а в других вариантах изобретения такой твердой фазой является колонка для очистки (например, колонка для аффинной хроматографии). Этот термин также включает неоднородную твердую фазу, состоящую из дискретных частиц, например, фазу, описанную в патенте США № 4275149.

«Липосома» представляет собой небольшую везикулу, состоящую из липидов различных типов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые могут быть использованы для доставки лекарственного средства (такого как анти-CD79b антитело) млекопитающему. Компоненты липосомы обычно расположены так, что они образуют бислой, аналогичный липидной структуре биологических мембран.

«Небольшая» молекула или «небольшая» органическая молекула определяется здесь как молекула, имеющая молекулярную массу ниже примерно 500 Дальтон.

Термин «индивидуум», «особь» или «пациент» означает позвоночное. В некоторых вариантах изобретения указанным позвоночным является млекопитающее.

Млекопитающими являются, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственные животные (такие как коровы), животные, участвующие в спортивных состязаниях, животные-компаньоны (такие как кошки, собаки и лошади), приматы, мыши и крысы. В некоторых вариантах изобретения указанным млекопитающим является человек.

Термин «фармацевтическая композиция» означает препарат в такой форме, которая обеспечивает эффективное биологическое действие активного ингредиента и не содержит других компонентов, которые могут быть чрезмерно токсичными для индивидуума, которому вводят указанный состав. Такой состав может быть стерильным.

«Стерильный» состав является асептическим, то есть он не содержит живых микроорганизмов и их спор.

Используемый здесь термин «эффективное количество» антитела означает количество, достаточное для достижения конкретных целей. «Эффективное количество», в зависимости от конкретной цели, может быть определено эмпирически и рутинным способом.

Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество антитела или другого лекарственного средства, эффективного для «лечения» заболевания или расстройства у индивидуума или млекопитающего. В случае рака такое терапевтически эффективное количество лекарственного средства может снижать число раковых клеток;

уменьшать размер опухоли; ингибировать (то есть замедлять до некоторой степени, а предпочтительно прекращать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (то есть замедлять до некоторой степени, а предпочтительно прекращать) развитие метастазов опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или ослаблять, до некоторой степени, один или несколько симптомов, ассоциированных с раком. См. определение термина «лечение». Лекарственное средство, до некоторой степени, может предотвращать рост раковых клеток и/или уничтожать раковые клетки, и такое лекарственное средство может иметь цитостатическое и/или цитотоксическое действие. Термин «профилактически эффективное количество» означает количество, которое, при его введении в нужной дозе или в течение необходимого периода времени, является эффективным для достижения нужного профилактического результата. Поскольку профилактическая доза вводится индивидууму до начала развития заболевания или на ранней стадии его развития, то обычно, но необязательно, профилактически эффективное количество должно быть меньше терапевтически эффективного количества.

«Рост-ингибирующее количество» анти-CD79b антитела представляет собой количество, способное ингибировать рост клеток, а в частности, опухоли, например, раковых клеток, либо *in vitro*, либо *in vivo*. «Рост-ингибирующее количество» анти-CD79b антитела, используемое в целях ингибирования роста опухолевых клеток, может быть определено эмпирически и рутинным способом.

«Цитотоксическое количество» анти-CD79b антитела представляет собой количество, способное вызывать деструкцию клеток, а в частности, опухоли, например, раковых клеток, либо *in vitro*, либо *in vivo*. «Цитотоксическое количество» анти-CD79b антитела, используемое в целях ингибирования роста опухолевых клеток, может быть определено эмпирически и рутинным способом.

«CD79b-экспрессирующей клеткой» является клетка, которая экспрессирует эндогенный или трансфицированный полипептид CD79b, либо на клеточной поверхности, либо в секретируемой форме. «Раковая опухоль, экспрессирующая CD79b», представляет собой раковую опухоль, содержащую клетки, которые имеют на своей поверхности полипептид CD79b или продуцируют и секретируют полипептид CD79b. «Раковая опухоль, экспрессирующая CD79b», продуцирует, но необязательно, достаточные уровни полипептида CD79b на клеточной поверхности, что позволяет анти-CD79b антителу связываться с этим полипептидом и оказывать терапевтическое действие на раковое заболевание. В другом варианте изобретения «раковая опухоль, экспрессирующая CD79b», продуцирует и секретирует, но необязательно, достаточные уровни полипептида CD79b, что позволяет анти-CD79b антителу-антагонисту связываться с этим полипептидом и оказывать терапевтическое действие на раковое заболевание. В последнем случае указанным антагонистом может быть антысмысловой олигонуклеотид, который ослабляет, ингибирует или предупреждает продуцирование и секрецию секретируемого полипептида CD79b опухолевыми клетками. Раковой опухолью, которая «сверхэкспрессирует» полипептид CD79b, является опухоль, имеющая значительно более высокие уровни полипептида CD79b на клеточной поверхности, или продуцирует и секретирует такие более высокие уровни по сравнению с нераковыми клетками тканей того же типа. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией гена или повышением уровня транскрипции или трансляции. Сверхэкспрессия полипептида CD79b может быть определена с помощью детектирующего или прогностического анализа путем оценки повышения уровней белка CD79b, присутствующего на поверхности клетки, или секретируемого клеткой

(например, с помощью иммуногистохимического анализа с использованием анти-CD79b антител, продуцируемых против выделенного полипептида CD79b, который может быть получен методами рекомбинантных ДНК из выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CD79b; FACS-анализа и т.п.). Альтернативно или

5 дополнительно, уровни нуклеиновой кислоты или мРНК, кодирующей полипептид CD79b, в клетках могут быть измерены посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием нуклеиновокислотного зонда, соответствующего CD79b-кодирующей нуклеиновой кислоте или ее комплементу (FISH; см. заявку WO98/45479, опубликованную в октябре 1998 г.), с помощью саузерн-блот-анализа, нозерн-блот-

10 анализа или методами на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), такой как количественная ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР). Может быть также проведен анализ на сверхэкспрессию полипептида CD79b путем измерения уровня «слушивания» антигена в биологическую жидкость, такую как сыворотка, например, с помощью анализов на основе антител (см. также патент США № 4933294, выданный 12 июня

15 1990 г.; заявку WO91/05264, опубликованную 18 апреля 1991 г.; патент США № 5401638, выданный 28 марта 1995 г.; и Sias et al., *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)). Помимо вышеописанных анализов, специалистами в данной области могут быть проведены различные анализы *in vivo*. Так, например, клетки в организме пациента могут быть подвергнуты контактированию с антителом, которое помечено, но необязательно,

20 детектируемой меткой, например, радиоактивным изотопом, а связывание антитела с клеткой данного пациента может быть оценено, например, путем внешнего сканирования на радиоактивность или путем анализа биоптата, взятого у пациента, которому было введено это антитело.

Используемый здесь термин «иммуноадгезин» означает антитело-подобные молекулы,

25 которые обладают специфичностью связывания гетерологичного белка («адгезина») в комбинации с эффекторными функциями константных доменов иммуноглобулина. По своей структуре, иммуноадгезины содержат гибрид аминокислотной последовательности, обладающей нужной специфичностью связывания, но не являющейся антиген-распознающей последовательностью и антигенсвязывающим

30 сайтом антитела (то есть является «гетерологичным»), и последовательности константного домена иммуноглобулина. Адгезиновая часть молекулы иммуноадгезина обычно представляет собой непрерывную аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере сайт связывания с рецептором или лигандом. Последовательность константного домена иммуноглобулина в иммуноадгезине может

35 происходить от любого иммуноглобулина, такого как иммуноглобулин подтипов IgG-1, IgG-2, IgG-3 или IgG-4, IgA (включая IgA-1 и IgA-2), IgE, IgD или IgM.

Используемый здесь термин «метка» означает детектируемое соединение или композицию, которые непосредственно или опосредованно конъюгированы с антителом, так, чтобы они образовывали «меченое» антитело. Такая метка, сама по себе, может

40 быть детектируемой (например, метки-радиоизотопы или флуоресцентные метки), или, в случае ферментативной метки, она может катализировать химическую модификацию соединения-субстрата или композицию, которая является детектируемой.

Используемый здесь термин «цитотоксический агент» означает вещество, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает деструкцию

45 клеток. Этот термин включает радиоактивные изотопы (например, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические агенты, например, метотрексат, адриамицин, винкаалкалоиды (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или

другие интеркалирующие агенты, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины, происходящие от бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые или противораковые агенты, описанные ниже. Другие цитотоксические агенты описаны ниже. Опухолецидное средство вызывает деструкцию опухолевых клеток.

«Токсин» представляет собой любое вещество, способное оказывать ингибирующее действие на рост или пролиферацию клеток.

«Химиотерапевтическое средство» представляет собой химическое соединение, которое, независимо от механизма его действия, может быть использовано для лечения рака. Классами химиотерапевтических средств являются, но не ограничиваются ими, алкилирующие агенты, антиметаболиты, алкалоиды веретена ядовитых растений, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизирующие агенты и ингибиторы киназы.

Химиотерапевтическими средствами являются соединения, используемые в «терапии направленного действия» и в стандартной химиотерапии. Примерами

химиотерапевтических средств являются эрлотиниб (TARCEVA®; Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS No. 51-21-8), гемцитабин (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диамин, дихлорплатина(II), CAS No. 15663-27-1), карбоплатин (CAS No. 41575-94-4), паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло-[4.3.0]-нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)феноксид]-N,N-диметил-этанамин, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), и доксорубин (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, и рапамицин.

Другими примерами химиотерапевтических средств являются оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезомиб (VELCADE®, Millennium Pharm.), сутент (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), мезилат иматиниба (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фульвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафиниб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (IRESSA®, AstraZeneca), иринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), типифарниб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (не содержащий кремофора), сконструированные на основе альбумина композиции наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), вандетаниб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиrolимус (TORISEL®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (TELCYTA®, Telik), тиотепа и цислофосфамид (CYTOXAN®, NEOSAR®); алкисульфонаты, такие как бусульфид, импросульфид и пипосульфид; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его адозелизиновые,

карзелизиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая его синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, экстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новембихин, феностерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый аналог горчичного газа; нитрозомочевина, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, а в частности, калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., (1994) 33: 183-186); динемидин, включая динемидин А; бифосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин, а также неокарзиностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые энединовые антибиотики-хромофоры), аклациномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицины, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин и триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан и тестостерон; антиадренергические средства, такие как аминоглютетимид, митотан и трилостан; средство, восполняющее недостаток фолиевой кислоты, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдотраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и анзамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофилиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенаузоновая кислота; триакивон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангиудин); уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепа; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин, этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдотрексат; дауномицин; аминоптерин; капецитабин (XELODA®, Roche); ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (ДМФО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные всех вышеуказанных соединений.

В определение термина «химиотерапевтическое средство» также входят: (i) антигормональные средства, регулирующие или ингибирующие действие гормонов на

опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX®, цитрат тамоксифена), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® (цитрат торемифена); (ii) ингибиторы ароматазы, которые
 5 ингибируют фермент ароматазу и регулируют продуцирование эстрогенов в коре надпочечника, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® (ацетат мегестрола), AROMASIN® (эксеместан, Pfizer), форместанин, фадрозол, RIVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол, Novartis) и ARIMIDEX® (анастрозол, AstraZeneca); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид,
 10 лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (нуклеозидный цитозинный аналог 1,3-диоксолана); (iv) ингибиторы протеинкиназы, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липид-киназы; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, а в частности, олигонуклеотиды, ингибирующие экспрессию генов путей передачи сигнала, участвующих в пролиферации нежелательных клеток, таких как, например, PKC-альфа,
 15 Ralf и H-Ras, такие как облимержен (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii); рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например, ANGIOZYME®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как вакцины для генотерапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; ингибиторы топоизомеразы 1, такие как LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; (ix)
 20 антиангиогенные агенты, такие как бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech) и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные всех вышеперечисленных соединений.

В определение термина «химиотерапевтическое средство» также входят терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (AVASTIN®,
 25 Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панитумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб (OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), тозитумомаб (Bexxar, Corixa) и конъюгат «антитело-лекарственное средство», гемтузумаб, озогамицин (MYLOTARG®, Wyeth).

Используемый здесь термин “рост-ингибирующее средство” означает соединение или композицию, ингибирующие рост клеток, а в частности, раковых клеток, экспрессирующих CD79b, либо in vitro, либо in vivo. Таким образом, средством, ингибирующим рост клеток, может быть средство, значительно снижающее процент клеток, экспрессирующих CD79b, в фазе S. Примерами средств, ингибирующих рост
 35 клеток, являются средства, блокирующие прохождение клеточного цикла (в другой фазе, кроме фазы S), такие как средства, индуцирующие блокирование фазы G1 и фазы M. Классическими средствами, блокирующими фазу M, являются винкаалкалоиды (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Средствами,
 40 блокирующими фазу G1, а также блокирующими переход в фазу S, являются, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в публикации *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn & Israel, eds., Chapter 1, entitled “Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs”,
 45 Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), а в частности, на стр.13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой противораковые лекарственные средства, получаемые из дерева тис. Доцетаксел (Таксотер®, Rhone-Poulenc Rorer), получаемый из Европейского тиса, представляет собой полусинтетический аналог

паклитаксела (Таксола®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел индуцируют сборку микротрубочек из тубулиновых димеров и стабилизируют микротрубочки путем предупреждения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза клеток.

“Доксорубицин” представляет собой антрациклиновый антибиотик. Доксорубицин имеет полное химическое название (8S-цис)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксид- α -L-ликсогексапиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион.

Термин “цитокин” является общим термином, относящимся к белкам, которые высвобождаются одной клеточной популяцией и которые действуют на другие клетки как межклеточные медиаторы. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и стандартные полипептидные гормоны. Помимо вышеуказанных определений, понятие “цитокины” также включает гормоны роста, такие как человеческий гормон роста, N-метионильный человеческий гормон роста и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреоид-стимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста гепатоцитов, фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли- α и - β ; мюллеровский ингибирующий фактор; пептид, ассоциированный с мышинным гонадотропином; ингибин; активин; васкулярный эндотелиальный фактор роста; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервных тканей, такие как NGF- β ; тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β ; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); факторы, индуцирующие остеогенез; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ ; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарный-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; фактор некроза опухоли, такой как TNF- α или TNF- β ; и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). Используемый здесь термин “цитокин” включает белки, происходящие от природных источников или от рекомбинантной клеточной культуры, и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

Используемый здесь термин “вкладыш в упаковку” означает инструкции, которые обычно вложены в предназначенные для продажи упаковки терапевтических продуктов и в которых имеется информация, касающаяся показаний, способа применения, дозы, способа введения, противопоказаний и/или предупреждений относительно применения таких терапевтических продуктов.

Термин «внутриклеточный метаболит» означает соединение, образующееся в результате метаболического процесса или метаболической реакции конъюгата «антитело-лекарственное средство» (ADC) внутри клетки. Такими метаболическими процессами или реакциями может быть ферментативная реакция, такая как протеолитическое расщепление пептидного линкера ADC, или гидролиз функциональной группы, такой как гидразон, сложный эфир или амид. Внутриклеточными метаболитами являются, но не ограничиваются ими, антитела и свободное лекарственное средство, которые подвергаются внутриклеточному расщеплению после поступления в клетку, диффузии или поглощения в клетку, или транспорта в клетку.

Термины «расщепляемый внутри клеток» и «внутриклеточное расщепление» относятся к процессу метаболизма или реакции конъюгата «антитело-лекарственное средство» (ADC) внутри клетки, где под действием таких процессов или реакций

происходит разрыв ковалентной связи, то есть линкера, между молекулой лекарственного средства (D) и антителом (Ab), что приводит к образованию свободного лекарственного средства, диссоциируемого из антитела внутри клеток. Таким образом, отщепляемыми группами ADC являются внутриклеточные метаболиты.

5 Термин “биологическая доступность” означает системную биологическую доступность (то есть уровни лекарственного средства в крови/плазме) для данного количества лекарственного средства, вводимого пациенту. “Биологическая доступность” является абсолютным термином, который определяет такие параметры, как время действия (скорость) и общее количество (уровень) лекарственного средства, которое
10 высвобождается из введенной лекарственной формы и поступает в общий кровоток.

Термин «цитотоксическая активность» означает цитотоксическое, цитостатическое или рост-ингибирующее действие ADC или внутриклеточного метаболита ADC. Цитотоксическая активность может быть выражена как величина IC_{50} , которая
15 представляет собой концентрацию (молярную или по массе на единицу объема), при которой выживает 50% клеток.

Используемый здесь термин «алкил» означает насыщенный прямой или разветвленный одновалентный углеводородный радикал, состоящий из 1-12 атомов углерода (C_1-C_{12}), где указанный алкильный радикал может быть, но необязательно,
20 независимо замещен одним или несколькими заместителями, описанными ниже. В другом варианте изобретения алкильный радикал имеет 1-8 атомов углерода (C_1-C_8) или 1-6 атомов углерода (C_1-C_6). Примерами алкильных групп являются, но не ограничиваются ими, метил (Me, $-CH_3$), этил (Et, $-CH_2CH_3$), 1-пропил (n-Pr, н-пропил, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-пропил (i-Pr, изопропил, $CH_2(CH_3)_2$), 1-бутил (n-Bu, н-бутил, $-CH_2CH_2$
25 CH_2CH_3), 2-метил-1-пропил (i-Bu, изобутил, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-бутил (s-Bu, втор-бутил, $CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-метил-2-пропил (t-Bu, трет-бутил, $C(CH_3)_3$), 1-пентил (н-пентил, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-пентил ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-пентил ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-метил-2-бутил ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-метил-2-бутил ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-метил-1-
30 бутил ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-метил-1-бутил ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-гексил ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-гексил ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-гексил ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-метил-2-пентил ($-C((CH_3)_2CH_2CH_2CH_3)$), 3-метил-2-пентил ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-метил-2-пентил ($-CH(CH_3)CH_2CH((CH_3)_2)$), 3-метил-3-пентил ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-метил-3-пентил ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-диметил-2-бутил ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-диметил-2-бутил ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$), 1-гептил, 1-октил и т.п.

Термин «алкенил» означает прямой или разветвленный одновалентный углеводородный радикал, состоящий из 2-8 атомов углерода (C_2-C_8) по меньшей мере
40 с одной ненасыщенной связью, то есть с углерод-углеродной связью и с sp^2 -двойной связью, где алкенильный радикал может быть, но необязательно, независимо замещен одним или несколькими заместителями, описанными в настоящей заявке, и включает радикалы, имеющие «цис»- и «транс»-ориентации, или альтернативно, “E”- и “Z”-ориентации. Примерами являются, но не ограничиваются ими, этиленил или винил ($-CH=CH_2$), аллил ($-CH_2CH=CH_2$) и т.п.

Термин «алкинил» означает прямой или разветвленный одновалентный углеводородный радикал, состоящий из 2-8 атомов углерода (C_2-C_8) по меньшей мере с одной ненасыщенной связью, то есть с углерод-углеродной связью и с sp -тройной

связью, где алкинильный радикал может быть, но необязательно, независимо замещен одним или несколькими заместителями, описанными в настоящей заявке. Примерами являются, но не ограничиваются ими, этинил ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), пропинил (пропаргил, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) и т.п.

5 Термины «карбоцикл», «карбоциклил», «карбоциклическое кольцо» и «циклоалкил» означают одновалентное неароматическое насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, имеющее 3-12 атомов углерода ($\text{C}_3\text{-C}_{12}$) в качестве моноциклического кольца или 7-12 атомов углерода в качестве бициклического кольца. Бициклические карбоциклы, имеющие 7-12 атомов, могут быть расположены, например, в виде бицикло-[4,5]-, -[5,5]
10 -, -[5,6]- или -[6,6]-системы, а бициклические карбоциклы, имеющие 9 или 10 атомов углерода на кольце, могут быть расположены, например, в виде бицикло-[5,6]- или [6,6]-системы, либо в виде мостиковых систем, таких как бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[2.2.2]октан и бицикло[3.2.2]нонан. Примерами моноциклических карбоциклов являются, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, цикlopентил, 1-циклопент-1-
15 енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогексадиенил, циклогептил, циклооктил, циклононил, циклодецил, циклоундецил, циклододецил и т.п.

Термин «арил» означает одновалентный ароматический углеводородный радикал, состоящий из 6-20 атомов углерода ($\text{C}_6\text{-C}_{20}$) и образующийся в результате удаления
20 одного атома водорода у одного атома углерода исходной ароматической системы. Некоторые арильные группы в репрезентативных структурах обозначены как “Ar”. Типичными арилами являются бициклические радикалы, содержащие ароматическое кольцо, конденсированное с насыщенным, частично ненасыщенным или ароматическим карбоциклическим кольцом. Типичными арильными группами являются, но не
25 ограничиваются ими, радикалы, происходящие от бензола (фенила), замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила, инденила, инданила, 1,2-дигидронафталина, 1,2,3,4-тетрагидронафталина и т.п. Арильные группы независимо замещены, но необязательно, одним или несколькими заместителями, описанными в настоящей заявке.

30 Термины «гетероцикл», «гетероциклил» и «гетероциклическое кольцо» являются взаимозаменяемыми и означают насыщенный или частично ненасыщенный (то есть имеющий одну или две двойных и/или тройных связи на кольце) карбоциклический радикал, имеющий от 3 до 20 атомов на кольце, где по меньшей мере один атом на
кольце представляет собой гетероатом, выбранный из атомов азота, кислорода, фосфора и серы, а остальными атомами на кольце являются атомы C, где один или несколько атомов на кольце независимо замещены, но необязательно, одним или несколькими
35 заместителями, описанными ниже. Гетероцикл может представлять собой моноцикл, имеющий от 3 до 7 членов на кольце (2-6 атомов углерода и 1-4 гетероатома, выбранных из N, O, P и S), или бицикл, имеющий от 7 до 10 членов на кольце (4-9 атомов углерода и 1-6 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например, бицикло-[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]-
40 или -[6,6]-систему. Гетероциклы описаны у Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968), а в частности, в главах 1, 3, 4, 6, 7 и 9; в публикации “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (представленной John Wiley & Sons, New York, 1950), а в частности, в томах 13, 14, 16,
45 19 и 28; и в J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. Термин «гетероциклил» также включает радикалы, а именно гетероциклические радикалы, конденсированные с насыщенным, с частично ненасыщенным или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Примерами гетероциклических колец являются, но не ограничиваются ими,

пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидротиопиранил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, гомопиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, гомопиперидинил, оксепиранил, тиепиранил, оксазепинил, диазепинил, 5 тиазепинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2Н-пиранил, 4Н-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротиенил, дигидрофуранил, пиразолидинилимидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[4.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0]гептанил, азабицикло[2.2.2]гексанил, 3Н-индолил, хинолизинил и N-пиридилмочевины. В объем данного определения также 10 входят спиромолекулы. Примерами гетероциклических групп, в которых 2 атома углерода на кольце замещены оксо(=О)-группами, являются пиримидинонил и 1,1-диоксо-тиоморфолинил. Описанные здесь гетероциклические группы независимо замещены, но необязательно, одним или несколькими заместителями, описанными в настоящей заявке.

15 Термин «гетероарил» означает одновалентный ароматический радикал, состоящий из 5-, 6- или 7-членных колец, и включает конденсированные циклические системы (по меньшей мере одна из которых является ароматической), состоящие из 5-20 атомов, содержащих один или несколько гетероатомов, независимо выбранных из атомов азота, кислорода и серы. Примерами гетероарильных групп являются пиридинил (включая, 20 например, 2-гидроксипиридинил), имидазолил, имидазопиридинил, пиримидинил (включая, например, 4-гидроксиимидинил), пиразолил, триазолил, пиразинил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксазолил, изотиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолизинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, птеридинил, 25 пуринил, оксадиазолил, триазолил, тиадиазолил, тиадиазолил, фуразанил, бензофуразанил, бензотиофенил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил и фуропиридинил. Гетероарильные группы независимо замещены, но необязательно, одним или несколькими заместителями, описанными в настоящей заявке.

30 Гетероциклические или гетероарильные группы могут быть связаны, где это возможно, через атом углерода (связаны с атомом углерода) или через атом азота (связаны с атомом азота). Неограничивающими примерами связанных через углерод гетероциклов или гетероариллов являются гетероциклы или гетероарилы, связанные в 35 положении 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина, в положении 3, 4, 5 или 6 пиридазина, в положении 2, 4, 5 или 6 пиримидина, в положении 2, 3, 5 или 6 пиразина, в положении 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тиюфурана, тиюфена, пиррола или тетрагидропиррола, в положении 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола, в положении 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола, в положении 2 или 3 азиридина, в положении 2, 3 или 4 азетидина, в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина или в положении 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 40 8 изохинолина.

Неограничивающими примерами связанных через азот гетероциклов или гетероариллов являются гетероциклы или гетероарилы, связанные в положении 1 45 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина, 1Н-индазола; в положении 2 изоиндола или изоиндолина, в положении 4 морфолина и в положении 9 карбазола или β-карболина.

“Алкилен” представляет собой насыщенный, разветвленный, одноцепочечный или

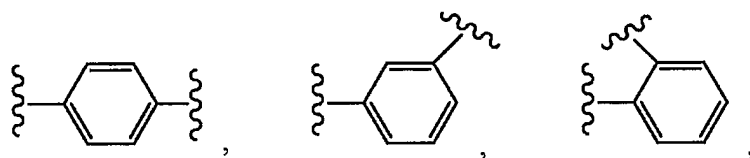
циклический углеводородный радикал, состоящий из 1-18 атомов углерода и имеющий два одновалентных радикальных центра, образованных в результате удаления двух атомов водорода у двух одинаковых или различных атомов углерода исходного алкана. Типичными алкиленовыми радикалами являются, но не ограничиваются ими, метилен (5 $-\text{CH}_2-$), 1,2-этил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-пропил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-бутил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) и т.п.

« C_1 - C_{10} алкилен» представляет собой прямую насыщенную углеводородную группу формулы $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$. Примерами C_1 - C_{10} алкиленов являются метилен, этилен, пропилен, 10 бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен и декален.

«Алкенилен» представляет собой ненасыщенный, разветвленный, одноцепочечный или циклический углеводородный радикал, состоящий из 2-18 атомов углерода и имеющий два одновалентных радикальных центра, образованных в результате удаления двух атомов водорода у двух одинаковых или различных атомов углерода исходного алкена. Типичными алкениленовыми радикалами являются, но не ограничиваются ими, 15 1,2-этилен ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

«Алкинилен» представляет собой ненасыщенный, разветвленный, одноцепочечный или циклический углеводородный радикал, состоящий из 2-18 атомов углерода и имеющий два одновалентных радикальных центра, образованных в результате удаления двух атомов водорода у двух одинаковых или различных атомов углерода исходного алкина. Типичными алкиниленовыми радикалами являются, но не ограничиваются ими, ацетилен ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), пропаргил ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$) и 4-пентинил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-$). 20

«Арилен» представляет собой арильную группу, которая имеет две ковалентных связи и может присутствовать в орто-, мета- или пара-конфигурациях, как показано на 25 нижеследующих структурах:



где фенильная группа может быть незамещенной, либо она может быть замещена 1-4 группами, включая, но не ограничиваясь ими, $-\text{C}_1$ - C_8 -алкил, $-\text{O}-(\text{C}_1$ - C_8 -алкил), -арил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}$ 35 $(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, галоген, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ и $-\text{CN}$; где каждый из R' независимо выбран из H , $-\text{C}_1$ - C_8 -алкила и арила.

«Арилалкил» представляет собой ациклический алкильный радикал, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, обычно, концевой атом углерода или sp^3 -атом углерода, заменен арильным радикалом. Типичными арилалкильными 40 группами являются, но не ограничиваются ими, бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и т.п. Арилалкильная группа содержит от 6 до 20 атомов углерода; так, например, алкильная часть, включая алканильную, алкенильную или алкинильную части арилалкильной группы, имеет 1-6 атомов углерода, а арильная часть имеет 5-14 45 атомов углерода.

«Гетероарилалкил» представляет собой ациклический алкильный радикал, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, обычно, концевой атом

углерода или sp^3 -атом углерода, заменен гетероарильным радикалом. Типичными гетероарилалкильными группами являются, но не ограничиваются ими, 2-бензимидазолилметил, 2-фурилэтил и т.п. Гетероарилалкильная группа имеет от 6 до 20 атомов углерода; так, например, алкильная часть, включая алканильную, алкенильную или алкинильную части гетероарилалкильной группы, имеет 1-6 атомов углерода, а гетероарильная часть имеет 5-14 атомов углерода и 1-3 гетероатома, выбранных из N, O, P и S. Гетероарильная часть гетероарилалкильной группы может представлять собой моноцикл, имеющий от 3 до 7 членов на кольце (2-6 атомов углерода), или бицикл, имеющий от 7 до 10 членов на кольце (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатома, выбранных из N, O, P и S), например, бицикло-[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- или -[6,6]-систему.

Используемый в этой заявке термин «пролекарство» означает предшественник или производное соединения согласно изобретению, которые, по сравнению с родительским соединением или лекарственным средством, являются менее цитотоксичными по отношению к опухолевым клеткам и способны ферментативно или гидролитически активироваться или превращаться в более активную зрелую форму. См., например, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp.375-382, 615th Meeting Belfast (1986) и Stella et al. "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp.247-267, Humana Press (1985). Пролекарствами согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, фосфат-содержащие пролекарства; тиофосфат-содержащие пролекарства; сульфат-содержащие пролекарства; пептид-содержащие пролекарства; пролекарства, модифицированные D-аминокислотой; гликозилированные пролекарства; β -лактам-содержащие пролекарства; пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид; или пролекарства, содержащие необязательно замещенный фенилацетамид; 5-фторцитозинового и другие 5-фторуридинового пролекарства, которые могут быть превращены в более активное цитотоксическое свободное лекарственное средство. Примерами цитотоксических лекарственных средств, которые могут быть дериватизированы с получением пролекарственной формы для ее использования в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, соединения согласно изобретению и химиотерапевтические средства, описанные выше.

Термин «метаболит» означает продукт, продуцируемый в результате метаболизма конкретного соединения или его соли в организме. Метаболиты соединения могут быть идентифицированы рутинными методами, известными специалистам, а их активность может быть определена с помощью анализов, описанных в настоящей заявке. Такие продукты могут образовываться, например, в результате окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, дезамидирования, этерификации, деэтерификации, ферментативного расщепления вводимого соединения и т.п. В соответствии с этим, настоящее изобретение охватывает метаболиты соединений согласно изобретению, включая соединения, продуцируемые способом, включающим контактирование соединения согласно изобретению с организмом млекопитающего в течение периода времени, достаточного для образования продукта метаболизма.

«Липосома» представляет собой небольшую везикулу, состоящую из липидов различных типов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые могут быть использованы для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно расположены так, что они образуют бислой, аналогичный липидному бислою в биологических мембранах.

Термин «линкер» означает химическую группу, содержащую ковалентную связь или

цепь атомов, которые ковалентно связывают антитело с молекулой лекарственного средства. В различных вариантах изобретения линкером является двухвалентный радикал, такой как алкилдиил, арилдиил, гетероарилдиил, такие группы, как $-(CR_2)_nO$ $(CR_2)_n-$, повторяющиеся звенья алкилокси (например, полиэтиленокси, ПЭГ, полиметиленокси) и алкиламино (например, полиэтиленамино, JeffamineTM), и двухосновный сложный эфир и амиды, включая сукцинат, сукцинамид, дигликолят, малонат и капроамид.

Термин “хиральный” относится к молекулам, которые не совмещаются с их зеркально отображенным аналогом, а термин “ахиральный” относится к молекулам, которые совмещаются с их зеркально отображенным аналогом.

Термин “стереоизомеры” означает соединения, которые имеют идентичную химическую структуру, но отличаются пространственным расположением атомов или групп.

Термин “диастереомер” означает стереоизомер с двумя или несколькими хиральными центрами, молекулы которого не являются зеркальным отображением друг друга. Диастереомеры имеют различные физические свойства, например, температуры плавления, точки кипения, спектральные свойства и реакционную способность. Смеси диастереомеров могут быть разделены высокоразрешающими аналитическими методами, такими как электрофорез и хроматография.

Термин “энантиомеры” означает два стереоизомера соединения, зеркальные отображения которых не совмещаются друг с другом.

Определения и обозначения используемых здесь стереохимических терминов в общих чертах приводятся у S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, то есть они способны вращать плоскость плоскополяризованного света. В описании оптически активного соединения, префиксы D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно его (их) хирального(ых) центра(ов). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения плоскополяризованного света данным соединением, а (-) или l означает, что данное соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для данной химической структуры эти стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они являются зеркальным отображением друг друга. Специфический стереоизомер может также называться энантиомером, а смесь таких изомеров часто называется энантиомерной смесью. Смесь 50:50 энантиомеров называется рацемической смесью или рацематом, который может образовываться в том случае, если в химической реакции или в химическом процессе отсутствует стереоселективность или стереоспецифичность. Термины “рацемическая смесь” и “рацемат” означают эквимольную смесь двух энантиомерных молекул, не обладающих оптической активностью.

Термин «таутомер» или «таутомерная форма» означает структурные изомеры с различными энергиями, которые могут превращаться друг в друга из-за низкого энергетического барьера. Так, например, протонными таутомерами (также известными как прототропные таутомеры) являются таутомеры, которые превращаются друг в друга под действием миграции протона, такой как кето-енольная и имин-енаминовая изомеризация. Валентность таутомеров определяется взаимными превращениями в результате реорганизации некоторых связанных электронов.

Используемый здесь термин “фармацевтически приемлемая соль” означает фармацевтически приемлемые органические или неорганические соли соединения согласно изобретению. Примерами таких солей являются, но не ограничиваются ими, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, 5 кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат «мезилат», этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Термин “фармацевтически приемлемая соль” может включать 10 и другую молекулу, такую как ион ацетата, ион сукцината или другой противоион. Такой противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую молекулу, которая стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре более чем один заряженный атом. В случае, если множество заряженных атомов является частью 15 фармацевтически приемлемой соли, то такая соль может иметь множество противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Если соединением согласно изобретению является основание, то нужная фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим методом, 20 известным специалистам, например, путем обработки свободного основания неорганической кислотой, такой как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, метансульфоновая кислота, фосфорная кислота и т.п., или органической кислотой, такой как уксусная кислота, трифторуксусная кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая 25 кислота, малоновая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пиранозидиловая кислота, такая как глюкуроновая кислота или галактуроновая кислота; альфа-гидроксикислота, такая как лимонная кислота или винная кислота, аминокислота, такая как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, ароматическая кислота, такая как бензойная кислота или 30 коричная кислота, сульфоновая кислота, такая как п-толуолсульфоновая кислота или этансульфоновая кислота, или т.п.

Если соединением согласно изобретению является кислота, то нужная фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим методом, например, путем 35 обработки свободной кислоты неорганическим или органическим основанием, таким как амин (первичный, вторичный или третичный), гидроксид щелочного металла или гидроксид щелочноземельного металла, или т.п. Репрезентативными примерами подходящих солей являются, но не ограничиваются ими, органические соли, происходящие от аминокислот, таких как глицин и аргинин, аммиака, первичных, вторичных и третичных аминов, и циклических аминов, таких как пиперидин, морфолин 40 и пиперазин, и неорганические соли, происходящие от натрия, кальция, калия, магния, марганца, железа, меди, цинка, алюминия и лития.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что вещество или композиция должны быть химически и/или токсикологически совместимыми с другими 45 ингредиентами, составляющими данную композицию, и/или с организмом млекопитающего, которому вводят данную композицию.

Термин «сольват» означает ассоциацию или комплекс одной или нескольких молекул растворителя и соединения согласно изобретению. Примерами растворителей, которые образуют сольваты, являются, но не ограничиваются ими, вода, изопропанол, этанол,

метанол, ДМСО, этилацетат, уксусная кислота и этаноламин. Термин «гидрат» означает комплекс, в котором молекулой растворителя является вода.

Термин «защитная группа» означает заместитель, который обычно используется для блокирования или защиты конкретной функциональной группы, реагирующей с другой функциональной группой на соединении. Так, например, «аминозащитная группа» представляет собой заместитель, присоединенный к аминогруппе, который блокирует или защищает функциональную аминогруппу в данном соединении. Подходящими аминозащитными группами являются ацетил, трифторацетил, трет-бутоксикарбонил (BOC), бензилоксикарбонил (CBZ) и 9-флуоренилметиленоксикарбонил (Fmoc). Аналогичным образом, «гидрокси-защитная группа» означает заместитель гидроксигруппы, который блокирует или защищает функциональную гидроксигруппу. Подходящими защитными группами являются ацетил и силил. «Карбокси-защитная группа» означает заместитель карбоксигруппы, который блокирует или защищает функциональную карбоксигруппу. Стандартными карбокси-защитными группами являются фенилсульфонилэтил, цианоэтил, 2-(триметилсилил)этил, 2-(триметилсилил)этоксиметил, 2-(п-толуолсульфонил)этил, 2-(п-нитрофенилсульфенил)этил, 2-(дифенилфосфино)этил, нитроэтил и т.п. Общее описание защитных групп и их применение можно найти в публикации T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

Термин «уходящая группа» означает функциональную группу, которая может быть замещена другой функциональной группой. Некоторые уходящие группы хорошо известны специалистам, и примерами этих групп являются, но не ограничиваются ими, галогенид (например, хлорид, бромид, йодид), метансульфонил (мезил), п-толуолсульфонил (тозил), трифторметилсульфонил (трифлат) и трифторметилсульфонат.

Обозначения

Линкерные компоненты:

МС=6-малеимидокапроил

Val-Cit or "vc"=валин-цитруллин (репрезентативный дипептид в линкере, отщепляемом протеазой)

Цитруллин=2-амино-5-уреидопентановая кислота

РАВ=п-аминобензилоксикарбонил (пример «самоудаляющегося» линкерного компонента)

Me-Val-Cit=N-метил-валин-цитруллин (где пептидная связь линкера была модифицирована в целях предотвращения его расщепления катепсином В)

МС(PEG)6-ОН=малеимидокапроил-полиэтиленгликоль (может быть присоединен к цистеинам антител).

Цитотоксические лекарственные средства:

ММАЕ=монометилауристатин Е (мол.м. (MW) 718)

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

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

ММАF-TEG=ММАF с тетраэтиленгликолем, связанным с фенилаланином сложноэфирной связью

ММАF-NtBu=N-трет-бутил, связанный с С-концом ММАF амидной связью

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

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

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

Другие используемые здесь сокращения имеют следующие значения: AE означает ауристатин E, Boc означает N-(трет-бутоксикарбонил), cit означает цитруллин, dap означает долапроин, DCC означает 1,3-дициклогексилкарбодиимид, DCM (ДХМ) означает дихлорметан, DEA означает диэтиламин, DEAD означает

5 диэтилазодикарбоксилат, DEPC означает диэтилфосфорилцианидат, DIAD означает диизопропилазодикарбоксилат, DIEA означает N,N-диизопропилэтиламин, dil означает долаизолейцин, DMA означает диметилацетамид, DMAP означает 4-
диметиламинопиридин, DME означает диметиловый эфир этиленгликоля (или 1,2-
диметоксиэтан), DMF (ДМФ) означает N,N-диметилформамид, DMSO (ДМСО) означает
10 диметилсульфоксид, doe означает долафенин, dov означает N,N-диметилвалин, DTNB
означает 5,5'-дителиобис(2-нитробензойную кислоту), DTPA означает
диэтилентриаминопентауксусную кислоту, DTT означает дитиотреитол, EDCI означает
гидрохлорид 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида, EEDQ означает 2-этокси-
1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин, ES-MS означает масс-спектрометрию
15 электрораспылением, EtOAc означает этилацетат, Fmoc означает N-(9-
флуоренилметоксикарбонил), gly означает глицин, HATU означает гексафторфосфат
O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония, HOBt означает 1-
гидроксibenзотриазол, HPLC (ВЭЖХ) означает высокоэффективную жидкостную
хроматографию, ile означает изолейцин, lys означает лизин, MeCN (CH₃CN) означает
20 ацетонитрил, MeOH означает метанол, Mtr означает 4-анизилдифенилметил (или 4-
метокситритил), nor (нор) означает (1S,2R)-(+)-норэфедрин, PBS означает забуференный
фосфатом физиологический раствор (pH 7,4), PEG (ПЭГ) означает полиэтиленгликоль,
Ph означает фенил, Pnp означает п-нитрофенил, MC означает 6-малеимидокапроил,
phe означает L-фениламин, PyBop означает гексафторфосфат бром-трис-
25 пирролидинофосфония, SEC означает эксклюзионную хроматографию, Su означает
сукцинимид, TFA означает трифторуксусную кислоту, TLC (ТСХ) означает
тонкослойную хроматографию, UV (УФ) означает ультрафиолетовое излучение, а val
означает валин.

30 «Свободная аминокислота цистеин» означает цистеиновый аминокислотный остаток,
который был введен в родительское антитело, имеет тиоловую функциональную группу
(-SH) и не образует пару в виде внутримолекулярного или межмолекулярного
дисульфидного мостика.

Термин “величина тиоловой реактивности” означает количественную характеристику
реакционной способности свободных цистеиновых аминокислотных остатков. Величина
35 тиоловой реактивности представляет собой процентное содержание свободных
цистеиновых аминокислотных остатков в сконструированном на основе цистеина
антителе, которое реагирует с реагентом, взаимодействующем с тиолом, при этом
максимальную величину такой реактивности принимают равной 1. Так, например,
свободная цистеиновая аминокислота в сконструированном на основе цистеина антителе,
40 которое реагирует с взаимодействующим с тиолом реагентом, таким как биотин-
малеимидный реагент, с 100% выходом с образованием меченного биотином антитела,
имеет величину тиоловой реактивности, составляющую 1,0. Другая цистеиновая
аминокислота, введенная в то же самое или другое родительское антитело, которое
реагирует с взаимодействующим с тиолом реагентом, с 80% выходом, имеет величину
45 тиоловой реактивности, составляющую 0,8. Другая цистеиновая аминокислота,
введенная в то же самое или другое родительское антитело, которое совсем не реагирует
с взаимодействующим с тиолом реагентом, имеет величину тиоловой реактивности,
составляющую 0. Определение величины тиоловой реактивности конкретного цистеина

может быть осуществлено с помощью ELISA-анализа, масс-спектро스코пии, жидкостной хроматографии, ауторадиографии или других количественных аналитических тестов.

“Родительское антитело” представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков заменены одним или несколькими цистеиновыми остатками. Родительское антитело может содержать нативную последовательность или последовательность дикого типа. По сравнению с другими нативными антителами, антителами дикого типа или модифицированными формами антитела, родительское антитело может иметь уже существующие модификации аминокислотной последовательности (такие как добавления, делеции и/или замены). Родительское антитело может быть направлено против представляющего интерес антигена-мишени, например, полипептида, имеющего важные биологические свойства. Также рассматриваются антитела против неполипептидных антигенов (таких как опухолеассоциированные гликолипидные антигены; см., патент США № 5091178).

Таблица 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 */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _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, 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, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

Таблица 1 (продолжение)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
5  * 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 '>' 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"
*
10 * 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] = {
15 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'))
20 };

main(ac, av)
int ac;
char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
25         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];
30    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 */

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

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
40
45

```

main

Таблица 1 (продолжение)

```

5      /* 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.
      */

10     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 */
15     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));
20     ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
            for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                ndely[yy] = yy;
25         }
            col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
            for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                dely[yy] = -ins0;

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

```

Таблица 1 (продолжение)

```

5                                     ...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'];

10    /* 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;
15        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
20        } else
            ndely[yy]++;
    }

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

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

                                     ...nw

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

45

```


Таблица 1 (продолжение)

```

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

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

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

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

```

45

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
*
5  * 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()
10 * 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 */
15 #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()
{
20     int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
25     olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
30     else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
35     else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}
40
45

```

print

Таблица 1 (продолжение)

getmat

```

/*
5  * 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];
10  double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
15  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++;
20          siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
25          if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
              nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
30          p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
    */
35  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",
40          nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

45

Таблица 1 (продолжение)

...getmat

```

5      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)",
10              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
15              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");
20          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 */
25      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[]
       */
30      static
      pr_align()
      {
          int nn;          /* char count */
          int more;
          register i;

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

```

pr_align

45

Таблица 1 (продолжение)

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

Таблица 1 (продолжение)

...dumpblock

```

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

```

40

45

Таблица 1 (продолжение)

...putline

```

5      int          i;
      register char *px;

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

10     /* 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);
  }

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

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

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

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

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

```

stars

40

45

Таблица 1 (продолжение)

```

5  /*
   * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
   */
   static
   stripname(pn)
       char    *pn;      /* file name (may be path) */
   {
       register char    *px, *py;

       py = 0;
       for (px = pn; *px; px++)
           if (*px == '/')
               py = px + 1;

       if (py)
           (void) strcpy(pn, py);
       return(strlen(pn));
   }
15

```

stripname

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
5  * cleanup() -- cleanup any tmp file
  * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
  * g_malloc() -- 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>

10 char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE *fj;
int cleanup();                             /* cleanup tmp file */
long lseek();
/*
  * remove any tmp file if we blow
  */

15 cleanup(i)                                cleanup
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
20 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
  * skip lines starting with ';', '<', or '>'
  * seq in upper or lower case
  */
char *
25 getseq(file, len)                        getseq
{
    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;
        30 while (fgets(line, 1024, fp)) {
            if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++)
                if (isupper(*px) || islower(*px))
                    tlen++;
        }
        35 if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
            exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

40

45

```

Таблица 1 (продолжение)

...getseq

```

5      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;
10             else if (islower(*px))
                  *py++ = toupper(*px);
              if (index("ATGCU", *(py-1)))
                  natgc++;
          }
      }
      *py++ = '\0';
      *py = '\0';
15      (void) fclose(fp);
      dna = natgc > (tlen/3);
      return(pseq+4);
}
char *
g_alloc(msg, nx, sz)
20      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_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
25    }
    return(px);
}

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

```

g_alloc

readjmps

45

Таблица 1 (продолжение)

...readjumps

```

5      if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
      }
      else
        break;
10     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;
15     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 */
20     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;
25     /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
      }
    }
    else
      break;
30   /* 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;
35   }
   if (fd >= 0)
     (void) close(fd);
   if (fj) {
     (void) unlink(jname);
     fj = 0;
     offset = 0;
40   }
}
}

```

45

Таблица 1 (продолжение)

```

5      /*
      * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
      */
      writejumps(ix)                                writejumps
      {
          int      ix;
          char      *mktmp();
          if (!fj) {
10              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);
              }
15          }
          (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
          (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
      }

```

III. Композиции и способы согласно изобретению

Настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителам или к их функциональным
фрагментам, а также к способу их применения для лечения гемопоэтических опухолей.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, которое
связывается, предпочтительно специфически, с любым из вышеописанных или
нижеописанных полипептидов. Таким антителом является, но необязательно,
моноклональное антитело, фрагмент антитела, включая Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-
фрагмент, диантитело, однодоменное антитело, химерное антитело, гуманизированное
антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое конкурентно ингибирует
связывание антитела против полипептида CD79b с его соответствующим антигенным
эпитопом. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно,
конъюгированы с рост-ингибирующим агентом или с цитотоксическим средством,
таким как токсин, включая, например, ауристатин, майтанзиноид, производное
доластатина или калихеамицин, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический
фермент или т.п. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно,
продуцированы в клетках СНО или в бактериальных клетках, а предпочтительно
индуцируют гибель клеток, с которыми они связываются. Антитела согласно
изобретению, используемые для детекции, могут быть детектируемо помечены,
присоединены к твердому носителю или т.п.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к гуманизированному
анти-CD79b антителу, где аффинность одновалентного антитела против CD79b
(например, аффинность антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против
CD79b), по существу аналогична аффинности одновалентного мышинового антитела
(например, аффинности мышинового антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента
против CD79b) или химерного антитела (например, аффинности химерного антитела,
используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b), содержащего
последовательность варибельного домена легкой и тяжелой цепи, либо состоящего
или по существу состоящего из указанной последовательности, представленной на
фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному
анти-CD79b антителу, где аффинность одновалентного антитела против CD79b

(например, аффинность антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b), например, по меньшей мере в 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 или 60 раз ниже аффинности одновалентного мышинового антитела (например, аффинности мышинового антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b) или химерного антитела (например, аффинности химерного антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b), содержащего последовательность вариабельного домена легкой и тяжелой цепи, или состоящего или по существу состоящего из указанной последовательности, представленной на фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность одновалентного антитела против CD79b (например, аффинность антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b), например, по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз выше аффинности одновалентного мышинового антитела (например, аффинности мышинового антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b) или химерного антитела (например, аффинности химерного антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b), содержащего последовательность вариабельного домена легкой и тяжелой цепи, или состоящего или по существу состоящего из указанной последовательности, представленной на фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность указанного анти-CD79b антитела в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) по существу аналогична аффинности мышинового антитела (например, аффинности антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) или химерного антитела (например, аффинности химерного антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b) в его двухвалентной форме, содержащего последовательность вариабельного домена легкой и тяжелой цепи, или состоящего или по существу состоящего из указанной последовательности, представленной на фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b), например, по меньшей мере в 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 или 60 раз ниже аффинности мышинового антитела (например, аффинности антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) или химерного антитела (например, аффинности химерного антитела, используемого в качестве Fab-фрагмента против CD79b) в его двухвалентной форме, содержащего последовательность вариабельного домена легкой и тяжелой цепи, или состоящего или по существу состоящего из указанной последовательности, представленной на фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b), например, по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз выше аффинности мышинового антитела (например, аффинности мышинового антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) или химерного антитела (например, аффинности химерного антитела, используемого в качестве IgG-фрагмента против CD79b) в его двухвалентной форме,

содержащего последовательность вариабельного домена легкой и тяжелой цепи, или состоящего или по существу состоящего из указанной последовательности, представленной на фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному
5 анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной
форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b)
составляет 0,4 нМ. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к
гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в
его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве
10 IgG против CD79b) составляет 0,4±0,04.

[illegible]

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,2 нМ. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в

составляет 0,14-0,26 нМ. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,16-0,24 нМ. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,18-0,22 нМ.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,5 нМ. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет $0,5 \pm 0,1$.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,4 нМ или выше. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,5 нМ или выше. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,6 нМ или выше. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,7 нМ или выше. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,3-0,7 нМ. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,4-0,6 нМ. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD79b антителу, где аффинность антитела против CD79b в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела, используемого в качестве IgG против CD79b) составляет 0,5-0,55 нМ.

В одном из аспектов изобретения аффинность одновалентного мышинового антитела против CD79b по существу аналогична аффинности связывания Fab-фрагмента, содержащего последовательности вариабельных доменов SEQ ID NO: 10 (фигуры 7A-B) и SEQ ID NO: 14 (фигуры 8A-B). В другом аспекте изобретения аффинность одновалентного мышинового антитела против CD79b по существу аналогична аффинности связывания Fab-фрагмента, содержащего последовательности вариабельных доменов антитела, полученного из гибридомы, депонированной в АТСС под № HB11413 20 июля 1993 г., или химерного антитела, содержащего вариабельные домены антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС под № HB11413 20 июля 1993 г.

Как хорошо известно специалистам, аффинность связывания лиганда с рецептором может быть определена с помощью любого из различных анализов и выражена в виде

ряда количественных величин. В соответствии с этим, в одном из вариантов изобретения, аффинность связывания выражена в величинах K_d и определяет природную аффинность связывания (например, с минимизированными эффектами авидности). Вообще говоря, и предпочтительно, аффинность связывания антитела измеряют *in vitro*, независимо от

того, присутствует ли оно во внеклеточной или в клеточно-ассоциированной среде. Как подробно описано в настоящей заявке, кратное различие в аффинности связывания может быть количественно оценено как отношение величины аффинности

одновалентного связывания гуманизированного антитела (например, в Fab-форме) и величины аффинности одновалентного связывания эталонного/сравниваемого антитела (например, в Fab-форме) (например, мышиного антитела, имеющего последовательности донорной гипервариабельной области), где величины аффинности связывания

определяют в аналогичных условиях проведения анализа. Таким образом, в одном из вариантов изобретения, кратное различие в аффинности связывания определяют как отношение величин K_d гуманизированного антитела в Fab-форме и указанного

эталонного/сравниваемого Fab-антитела. Так, например, в одном из вариантов изобретения, если антитело согласно изобретению (А) имеет аффинность, которая «в 3 раза ниже» аффинности эталонного антитела (М), то, если величина K_d для А равна 3х, величина K_d для М должна составлять 1х, а отношение « K_d для А к K_d для М» должно составлять 3:1. И наоборот, в одном из вариантов изобретения, если антитело

согласно изобретению (С) имеет аффинность, которая «в 3 раза выше» аффинности эталонного антитела (R), то, если величина K_d для С равна 1х, величина K_d для R должна составлять 3х, а отношение « K_d для С к K_d для R» должно составлять 1:3. Для

определения аффинности связывания может быть применен ряд различных анализов, известных специалистам, включая анализы, описанные в настоящей заявке, такие как,

например, анализ Biacore, радиоиммунноанализ (РИА) и ELISA.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, связывающемуся с CD79b, где указанное антитело содержит:

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

(i) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A15 представляет собой KASQSVDDYDGD SFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) и

(vi) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F10, где F1-F10 представляет собой TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136).

В одном из вариантов изобретения HVR-L1 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 131. В одном из вариантов изобретения HVR-L2 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 132. В одном

из вариантов изобретения HVR-L3 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов изобретения HVR-H1 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 134. В одном

из вариантов изобретения HVR-H2 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 135. В одном из вариантов изобретения HVR-H3 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 136.

последовательность SEQ ID NO: 135. В одном из вариантов изобретения HVR-H3 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 136. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению, содержащее эти последовательности (в комбинации, описанной в настоящей заявке), является

5 гуманизированным или человеческим.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, связывающемуся с CD79b, где указанное антитело содержит:

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

10 (i) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A15 представляет собой KASQSVDDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой AASNLES (SEQ ID NO: 132)

15 (iii) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой QQSNEEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) и

20 (vi) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F10, где F1-F10 представляет собой TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136); и

(b) по меньшей мере один вариант HVR, где указанный вариант последовательности HVR имеет модификацию по меньшей мере одного остатка последовательности, представленной в SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 или 136. В одном из вариантов

25 изобретения HVR-L1 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 131. В одном из вариантов изобретения HVR-L2 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 132. В одном из вариантов изобретения HVR-L3 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов изобретения HVR-H1 антитела согласно

30 изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 134. В одном из вариантов изобретения HVR-H2 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 135. В одном из вариантов изобретения HVR-H3 антитела согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 136. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению, содержащее эти последовательности (в комбинации, описанной в настоящей заявке), является гуманизированным или

35 человеческим.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, где каждая HVR содержит последовательность или состоит или по существу состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 и 136, и где SEQ ID NO: 131 соответствует HVR-L1, SEQ ID NO: 132 соответствует HVR-L2, SEQ ID NO: 133 соответствует HVR-L3, SEQ ID NO: 134 соответствует HVR-H1, SEQ ID NO: 135 соответствует HVR-H2, а SEQ ID NO: 136 соответствует HVR-H3. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению содержит HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждая из них в указанном порядке содержит SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 и 136.

45 Варианты HVR в антителе согласно изобретению могут иметь модификации одного или нескольких остатков в HVR. В одном из вариантов изобретения вариант HVR-L1

содержит одну замену в следующих положениях: A4 (K), A9 (E или S) и A10 (A или S). В одном из вариантов изобретения вариант HVR-L2 содержит 1-5 (1, 2, 3, 4 или 5) замен в любом одном положении или в комбинации следующих положений: B2 (S или G), B3 (R или G), B4 (K, R, Y, I, H или Q), B5 (R), B6 (G, K, A, R, S или L) и B7 (R, N, T или G). В одном из вариантов изобретения вариант HVR-L3 содержит 1-4 (1, 2, 3 или 4) замен в любом одном положении или в комбинации следующих положений: C1 (N или D), C2 (N или P), C3 (D или R), C5 (S, K, A, Q, D, L или G), C6 (A, E или N), C7 (A), C8 (R) и C9 (N). В одном из вариантов изобретения вариант HVR-H1 содержит 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) замен в любом одном положении или в комбинации следующих положений: D1 (P), D2 (F), D3 (P, S, Y, G или N), D4 (L или V), D5 (T, R, N, K, C, G или P), D6 (R, T, K или G), D8 (F), D9 (V или L) и D10 (S, Q, N или D). В одном из вариантов изобретения вариант HVR-H3 содержит 1-3 (1, 2 или 3) замен в любом одном положении или в комбинации следующих положений: F4 (R или I), F6 (I или F), F7 (K, C, R, V или F), F8 (L) и F9 (S). Буква(ы) в скобках после каждого положения означает(ют) репрезентативную замену аминокислоты; и, как будет очевидно специалисту в данной области, исходя из контекста настоящего описания, допустимость замены других аминокислот может быть оценена рутинными методами, известными специалистам и/или описанными в настоящей заявке. В одном из вариантов изобретения A9 в варианте HVR-L1 представляет собой E. В одном из вариантов изобретения F6 в варианте HVR-H3 представляет собой I. В одном из вариантов изобретения F7 в варианте HVR-H3 представляет собой R. В одном из вариантов изобретения F8 в варианте HVR-H3 представляет собой L. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-H3, где F6 представляет собой I, F7 представляет собой R, а F8 представляет собой L. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L1, где A9 представляет собой E, и вариант HVR-H3, где F6 представляет собой I, F7 представляет собой R, а F8 представляет собой L. В одном из вариантов изобретения A9 в варианте HVR-L1 представляет собой S. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L1, где A9 представляет собой S, и вариант HVR-H3, где F6 представляет собой I, F7 представляет собой R, а F8 представляет собой L.

В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L1, где A4 представляет собой K. В некоторых вариантах изобретения указанный вариант HVR-L1 содержит HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый из них, в указанном порядке, содержит последовательность SEQ ID NO: 132, 133, 134, 135 и 136. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-L1, также содержит HVR-L1, где A9 представляет собой E или S, и/или A10 представляет собой A или S. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-L1, также содержит вариант HVR-L3, где C6 представляет собой E или N, и/или C7 представляет собой A. В некоторых вариантах изобретения указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III. В одном из вариантов этих антител консенсусная каркасная последовательность содержит замену в положении 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах этих антител положение 71 представляет собой A, 73-T, и/или 78-A. В одном из вариантов этих антител указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI. В некоторых вариантах этих антител консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах указанных антител, положение (консенсусной последовательности

каркасной области человеческой легкой цепи κI) 4 представляет собой L, и/или положение 47 представляет собой F. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 и/или 80. В некоторых вариантах этих антител положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III) 48 представляет собой I, положение 67 представляет собой A, положение 69 представляет собой F, положение 71 представляет собой A, положение 73 представляет собой T, положение 75 представляет собой S, положение 78 представляет собой A, и/или положение 80 представляет собой M. В некоторых вариантах этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI. В одном из вариантов этих антител консенсусная последовательность каркасной области человеческой каркасной легкой цепи κI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител положение (в консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи κI) 4 представляет собой L и/или положение 47 представляет собой F.

В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L2, где B3 представляет собой R, B4 представляет собой K, B6 представляет собой G, а B7 представляет собой R. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L2, где B3 представляет собой R, B4 представляет собой Y, B6 представляет собой K, а B7 представляет собой R. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L2, где B3 представляет собой R, B4 представляет собой K, а B6 представляет собой G. В некоторых вариантах изобретения, антитело, содержащее указанный вариант HVR-L2, также содержит HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый из них, по порядку, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 131, 133, 134, 135 и 136. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-L2, также содержит вариант HVR-L1, где A9 представляет собой E или S и/или A10 представляет собой A или S. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-L2, также содержит вариант HVR-L3, где C6 представляет собой E или N и/или C7 представляет собой A. В некоторых вариантах изобретения указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области содержит замену в положении 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах этих антител, положение 71 представляет собой A, 73 представляет собой T, и/или 78 представляет собой A. В одном из вариантов этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI. В некоторых вариантах этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи κI) 4 представляет собой L, и/или 47 представляет собой F. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 и/или 80. В одном из вариантов этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III) 48 представляет собой I, 67 представляет собой A, 69 представляет собой F, 71 представляет собой A, 73 представляет собой T, 75 представляет собой S, 78 представляет собой A, и/или 80

представляет собой М. В некоторых вариантах этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи κI) 4 представляет собой L, и/или 47 представляет собой F.

В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L3, где C5 представляет собой К. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-L3, где C5 представляет собой S. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-L3, также содержит HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый из них, по порядку, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 131, 133, 134, 135 и 136. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-L3, также содержит вариант HVR-L1, где A9 представляет собой Е или S и/или A10 представляет собой А или S. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-L3, также содержит вариант HVR-L3, где C6 представляет собой Е или N и/или C7 представляет собой А. В некоторых вариантах изобретения, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области содержит замену в положении 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах этих антител, положение 71 представляет собой А, 73 представляет собой Т, и/или 78 представляет собой А. В одном из вариантов этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI. В некоторых вариантах этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи κI) 4 представляет собой L, и/или 47 представляет собой F. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 и/или 80. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III) 48 представляет собой I, 67 представляет собой А, 69 представляет собой F, 71 представляет собой А, 73 представляет собой Т, 75 представляет собой S, 78 представляет собой А, и/или 80 представляет собой М. В некоторых вариантах этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи κI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи κI) 4 представляет собой L, и/или 47 представляет собой F.

В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-H1, где D3 представляет собой Р, D5 представляет собой Т, D6 представляет собой R и D10 представляет собой N. В одном из вариантов изобретения антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-H1, где D3 представляет собой Р, D5 представляет собой N, D6 представляет собой R и D10 представляет собой N. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-H1, также содержит HVR-

L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый из них, по порядку, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 131, 133, 134, 135 и 136. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-H1, также содержит вариант HVR-L1, где A9 представляет собой E или S и/или A10 представляет собой A или S. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-H1, также содержит вариант HVR-L3, где C6 представляет собой E или N и/или C7 представляет собой A. В некоторых вариантах изобретения, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области содержит замену в положении 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах этих антител, положение 71 представляет собой A, 73 представляет собой T, и/или 78 представляет собой A. В одном из вариантов этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI. В некоторых вариантах этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи kI) 4 представляет собой L, и/или 47 представляет собой F. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 и/или 80. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III) 48 представляет собой I, 67 представляет собой A, 69 представляет собой F, 71 представляет собой A, 73 представляет собой T, 75 представляет собой S, 78 представляет собой A, и/или 80 представляет собой M. В некоторых вариантах этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи kI) 4 представляет собой L, и/или 47 представляет собой F.

В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-H3, где F6 представляет собой I и F8 представляет собой L. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант HVR-H3, где F6 представляет собой I, F7 представляет собой R, а F8 представляет собой L. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-H3, также содержит HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый из них, по порядку, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134 и 135. В некоторых вариантах изобретения антитело, содержащее указанный вариант HVR-H3, также содержит вариант HVR-L1, где A9 представляет собой E или S и/или A10 представляет собой A или S. В некоторых вариантах изобретения, антитело, содержащее указанный вариант HVR-H3, также содержит вариант HVR-L3, где C6 представляет собой E или N и/или C7 представляет собой A. В некоторых вариантах изобретения указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области

человеческой тяжелой цепи подгруппы III) 71 представляет собой A, 73 представляет собой T, и/или 78 представляет собой A. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III) 48 представляет собой I, 67 представляет собой A, 69 представляет собой F, 71 представляет собой A, 73 представляет собой T, и/или 78 представляет собой A. В одном из вариантов этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI. В некоторых вариантах этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи kI) 4 представляет собой L, и/или 47 представляет собой F. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 и/или 80. В некоторых вариантах этих антител, положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой тяжелой цепи подгруппы III) 48 представляет собой I, 67 представляет собой A, 69 представляет собой F, 71 представляет собой A, 73 представляет собой T, 75 представляет собой S, 78 представляет собой A, и/или 80 представляет собой M. В некоторых вариантах этих антител, указанные антитела также содержат консенсусную последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI. В одном из вариантов этих антител, консенсусная последовательность каркасной области человеческой легкой цепи kI содержит замену в положении 4 и/или 47. В некоторых вариантах этих антител положение (консенсусной последовательности каркасной области человеческой легкой цепи kI) 4 представляет собой L и/или 47 представляет собой F.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему одну, две, три, четыре, пять или все последовательности HVR, представленные на фигуре 9 (SEQ ID NO: 17-21) и/или на фигуре 10 (SEQ ID NO: 22-106).

Используемое терапевтическое средство, при его введении хозяину, предпочтительно вызывает слабый иммунный ответ или вообще не вызывает иммунного ответа у указанного хозяина. В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к указанному средству. Так, например, в одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, которое вырабатывает и/или предположительно вырабатывает гуморальный ответ у человека против мышиногo антитела (НАМА) на значительно более низком уровне по сравнению с антителом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 10 и 14 у индивидуума-хозяина. В другом примере настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, которое вырабатывает и/или предположительно вырабатывает у млекопитающего или у млекопитающего, не являющегося человеком, ответ против мышиногo антитела (НАМА). В одном из примеров антитело согласно изобретению вырабатывает ответ против мышиногo антитела на клинически приемлемом уровне или на более низком уровне.

Гуманизированное антитело согласно изобретению может содержать одну или несколько человеческих и/или человеческих консенсусных последовательностей негипервариабельной области (например, каркасной области) в вариабельном домене тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых вариантах изобретения, в человеческих и/или в человеческих консенсусных последовательностях негипервариабельной области

присутствуют одна или несколько дополнительных модификаций. В одном из вариантов изобретения, вариабельный домен тяжелой цепи антитела согласно изобретению содержит человеческую консенсусную каркасную последовательность, которая, в одном из вариантов изобретения, представляет собой консенсусную каркасную последовательность подгруппы III. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант консенсусной каркасной последовательности подгруппы III, модифицированной в одном положении аминокислотного остатка. Так, например, в одном из вариантов изобретения, вариант консенсусной каркасной последовательности подгруппы III может содержать замену в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 71, 73 и/или 78. В одном из вариантов изобретения, такой заменой является R71A, N73T и/или L78A, в любой их комбинации. Так, например, в одном из вариантов изобретения, вариант каркасной консенсусной последовательности тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73 и/или 78. В одном из вариантов изобретения, указанной заменой является V48I, F67A, I69F, R71A, N73T и/или L78A. Так, например, в одном из вариантов изобретения, вариант каркасной консенсусной последовательности тяжелой цепи подгруппы III содержит замену в положении 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 и/или 80. В одном из вариантов изобретения, указанной заменой является V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A и/или L80M. В одном из вариантов изобретения, вариабельный домен легкой цепи антитела согласно изобретению содержит человеческую консенсусную каркасную последовательность, которая, в одном из вариантов изобретения, представляет собой консенсусную каркасную последовательность kI. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант консенсусной каркасной последовательности kI, модифицированной по меньшей мере в одном положении аминокислоты. Так, например, в одном из вариантов изобретения, вариант консенсусной каркасной последовательности kI может содержать замену в положении 4. В одном из вариантов изобретения, указанной заменой является M4L. Так, например, в одном из вариантов изобретения, вариант консенсусной каркасной последовательности kI может содержать замену в положении 4 и/или 47. В одном из вариантов изобретения указанной заменой является M4L и/или L47F.

Как известно специалистам, и как более подробно описано ниже, положение аминокислоты/пограничная аминокислота, определяющая гипервариабельную область антитела, может варьироваться в зависимости от окружения данной аминокислоты и от различных ее характеристик, известных специалистам (как описано ниже). Некоторые положения в вариабельном домене могут рассматриваться как гибридные гипервариабельные положения, то есть эти положения могут, предположительно, находиться в гипервариабельной области в соответствии с одним набором критериев, а могут находиться за пределами гипервариабельной области в соответствии с другим набором критериев. Одно или несколько таких положений могут также присутствовать в удлинённых гипервариабельных областях (как более подробно определено ниже). Настоящее изобретение относится к антителам, содержащим модификации в этих гибридных гипервариабельных положениях. В одном из вариантов изобретения, такими гипервариабельными положениями являются одно или несколько положений 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 и 101-102 в вариабельном домене тяжелой цепи. В одном из вариантов изобретения, такими гибридными гипервариабельными положениями являются одно или несколько положений 24-29, 35-36, 46-49, 56 и 97 в вариабельном домене легкой цепи. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариант человеческой консенсусной каркасной последовательности подгруппы

человеческих антител, модифицированный в одном или нескольких гибридных гипервариабельных положениях.

В одном из аспектов изобретения, антитело согласно изобретению содержит
 5 вариабельный домен тяжелой цепи, включающий вариант консенсусной каркасной
 последовательности человеческой подгруппы III, модифицированный в одном или
 нескольких положениях 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 и 101. В одном из вариантов
 изобретения антитело содержит замену G26P. В одном из вариантов изобретения
 антитело содержит замену F27Y. В одном из вариантов изобретения антитело содержит
 10 замену T28P, S, Y, G или N. В одном из вариантов изобретения антитело содержит
 замену F29L или F29V. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену
 S30T, R, N, K, C, G или P. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену
 A33W или A33F. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену M34I,
 V или L. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену S35E, Q, N или
 D. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену V48I. В одном из
 15 вариантов изобретения антитело содержит замену S49G. В одном из вариантов
 изобретения антитело содержит замену Y58N. В одном из вариантов изобретения
 антитело содержит замену A60N. В одном из вариантов изобретения антитело содержит
 замену D61E. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену S62I. В
 одном из вариантов изобретения антитело содержит замену V63F. В одном из вариантов
 20 изобретения антитело содержит замену A93T. В одном из вариантов изобретения
 антитело содержит замену D101S.

В одном из аспектов изобретения антитело согласно изобретению содержит
 вариабельный домен легкой цепи, включающий вариант консенсусной каркасной
 последовательности человеческой подгруппы I каппа, модифицированный в одном или
 25 нескольких положениях 24, 27-29, 56 и 97. В одном из вариантов изобретения антитело
 содержит замену R24K. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену
 Q27K. В одном из вариантов изобретения антитело содержит замену S28D или E. В
 одном из вариантов изобретения антитело содержит замену I29G, A или S. В одном из
 вариантов изобретения антитело содержит замену S56R, N, T или G. В одном из
 30 вариантов изобретения антитело содержит замену T97N.

В одном из аспектов изобретения, антитело согласно изобретению содержит
 вариабельный домен тяжелой цепи, включающий вариант консенсусной каркасной
 последовательности человеческой подгруппы III, модифицированный в положениях 1,
 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или во всех положениях 26-30, 33-35, 48-49, 58,
 35 60-63, 93 и 101. В одном из вариантов изобретения такую модификацию выбирают из
 группы, состоящей из G26P, F27Y, T28P (S, Y, G или N), F29L (V), S30T (R, N, K, C, G
 или P), A33W (F), M34I (V или L), S35E (Q, N или D), V48I, S49G, Y58N, A60N, D61E, S62I,
 V63F, A93T и D101S. В некоторых вариантах изобретения, антитело согласно
 изобретению содержит вариант консенсусной каркасной последовательности подгруппы
 40 III, модифицированный в положениях 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 и/или 80. В одном из
 вариантов изобретения указанной заменой является V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S,
 L78A и/или L80M.

В одном из аспектов изобретения, антитело согласно изобретению содержит
 вариабельный домен легкой цепи, включающий вариант консенсусной каркасной
 45 человеческой последовательности каппа подгруппы I, модифицированный в положениях
 1, 2, 3, 4, 5 или во всех положениях 24, 27-29, 56 и 97. В одном из вариантов изобретения
 указанную модификацию выбирают из группы, состоящей из R24K, Q27K, S28D (E),
 I29G (A или S), S56R (N, T или G) и T97N. В некоторых вариантах изобретения, антитело

согласно изобретению содержит вариант консенсусной каркасной последовательности κI, модифицированный в положении 4 и/или 47. В одном из вариантов изобретения указанной заменой является M4L и/или L47F.

Антитело согласно изобретению может содержать любую подходящую человеческую или человеческую консенсусную каркасную последовательность легкой цепи, при условии, что такое антитело будет обладать нужными биологическими свойствами (например, желаемой аффинностью связывания). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере часть каркасной последовательности человеческой легкой цепи каппа (или всю указанную последовательность). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере часть каркасной консенсусной последовательности человеческой подгруппы I каппа (или всю указанную последовательность).

В одном из аспектов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой и/или легкой цепи, включающий каркасную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 (фигуры 7A-B) и/или 13 (фигуры 8A-B).

В одном из аспектов изобретения, антителом согласно изобретению является гуманизированное анти-CD79b антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством. В одном из аспектов изобретения гуманизированное анти-CD79b антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, ингибирует прогрессирование опухоли в ксенотрансплантатах.

В одном из аспектов изобретения гуманизированное антитело и химерное антитело являются одновалентными. В одном из вариантов изобретения гуманизированное и химерное антитела содержат одну Fab-область, связанную с Fc-областью. В одном из вариантов изобретения эталонное химерное антитело содержит последовательности вариабельных доменов, представленные на фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14) и связанные с человеческой Fc-областью. В одном из вариантов изобретения человеческой Fc-областью является область IgG (например, IgG1, 2, 3 или 4).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 164-166). В одном из вариантов изобретения вариабельный домен содержит последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 160-163). В одном из аспектов изобретения антитело содержит последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 167 и/или 168). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 15, SEQ ID NO: 164-166), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 15, SEQ ID NO: 160-163). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 15, SEQ ID NO: 164-166), и последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 5 (SEQ ID NO: 167 и/или 168). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 15, SEQ ID NO: 164-166), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 15, SEQ ID NO: 160-163), и последовательность

CH1 и/или Fc (фигура 15, SEQ ID NO: 167 и/или 168).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему
 5 варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 156-158). В одном из
 вариантов изобретения варьируемый домен содержит последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 152-155). В
 10 одном из вариантов изобретения указанное антитело содержит последовательность CL1, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 159). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 156-158), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 152-155), представленную на фигуре 15. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 156-158), и последовательность CL1 (SEQ ID NO: 159), представленную на фигуре 15. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 156-158), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 152-155), представленную на фигуре 15, и последовательность CL1, представленную на фигуре 15 (SEQ ID NO: 159).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему
 варьируемый домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-HC, HVR2-HC и/или HVR3-HC, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 183-185). В одном из
 25 вариантов изобретения варьируемый домен содержит последовательность FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC и/или FR4-HC, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 179-182). В одном из аспектов изобретения антитело содержит последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 186 и/или 187). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-HC, HVR2-HC и/или HVR3-HC (фигура 16, SEQ ID NO: 183-185), и последовательность FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC и/или FR4-HC (фигура 16, SEQ ID NO: 179-182). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-HC, HVR2-HC и/или HVR3-HC (фигура 16, SEQ ID NO: 182-185), и последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 5 (SEQ ID NO: 186 и/или 187). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-HC, HVR2-HC и/или HVR3-HC (фигура 16, SEQ ID NO: 183-185), и последовательность FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC и/или FR4-HC (фигура 16, SEQ ID NO: 179-182), и последовательность CH1 и/или Fc (фигура 16, SEQ ID NO: 186 и/или 187).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему
 40 варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 175-177). В одном из вариантов изобретения варьируемый домен содержит последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 171-174). В одном из вариантов изобретения указанное антитело содержит последовательность CL1, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 178). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO:

175-177), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 171-174), представленную на фигуре 16. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 175-177), и последовательность CL1 (SEQ ID NO: 178), представленную на фигуре 16. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 175-177), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 171-174), представленную на фигуре 16, и последовательность CL1, представленную на фигуре 16 (SEQ ID NO: 178).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 202-204). В одном из вариантов изобретения вариабельный домен содержит последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 198-201). В одном из аспектов изобретения антитело содержит последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 205 и/или 206). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 17, SEQ ID NO: 202-204), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 17, SEQ ID NO: 198-201). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 17, SEQ ID NO: 202-204), и последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 205 и/или 206). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 17, SEQ ID NO: 202-204), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 17, SEQ ID NO: 198-201), и последовательность CH1 и/или Fc (фигура 17, SEQ ID NO: 205 и/или 206).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему вариабельный домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 194-196). В одном из вариантов изобретения вариабельный домен содержит последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 190-193). В одном из вариантов изобретения указанное антитело содержит последовательность CL1, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 197). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 194-196), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 190-193), представленную на фигуре 17. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 194-196), и последовательность CL1 (SEQ ID NO: 197), представленную на фигуре 17. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 194-196), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 190-193), представленную на фигуре 17, и последовательность CL1, представленную на фигуре 17 (SEQ ID NO: 197).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему
 5 варьируемый домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 221-223). В одном из вариантов изобретения варьируемый домен содержит последовательность FR1-НС,
 10 FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 217-220). В одном из аспектов изобретения антитело содержит последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 224 и/или 225). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура
 15 18, SEQ ID NO: 221-223), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 18, SEQ ID NO: 217-220). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 18, SEQ ID NO: 221-223), и последовательность CH1 и/или Fc, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 224 и/или 225). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен тяжелой цепи, включающий последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС (фигура 18, SEQ ID NO: 221-223), и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС (фигура 18, SEQ ID NO: 217-220), и последовательность CH1 и/или Fc (фигура 18, SEQ ID NO: 224 и/или 225).

20 В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 213-215). В одном из вариантов изобретения варьируемый домен содержит последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 209-212). В
 25 одном из вариантов изобретения указанное антитело содержит последовательность CL1, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 216). В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 213-215), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 209-212), представленную на фигуре 18. В одном из вариантов изобретения, антитело
 30 согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 213-215), и последовательность CL1 (SEQ ID NO: 216), представленную на фигуре 18. В одном из вариантов изобретения, антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, включающий последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC (SEQ ID NO: 213-215), и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC (SEQ ID NO: 209-212), представленную на фигуре 18, и последовательность CL1, представленную на фигуре 18 (SEQ ID NO: 216).

В одном из аспектов изобретения, антителами согласно изобретению являются
 40 сконструированные на основе цистеина антитела, в которых одна или несколько аминокислот родительского антитела заменены свободной цистеиновой аминокислотой, как описано в заявке WO 2006/034488 и в заявке на патент США 2007/0092940 (которые полностью вводятся в настоящее описание посредством ссылки). Таким образом может быть сконструирована любая форма анти-CD79b антитела, то есть мутированное
 45 антитело. Так, например, Fab-фрагмент родительского антитела может быть сконструирован так, чтобы он представлял собой сконструированный на основе цистеина Fab, обозначенный здесь «*thioFab*». Аналогичным образом, может быть сконструировано родительское моноклональное антитело, представляющее собой

«тиоMab». Следует отметить, что мутация в одном сайте приводит к включению одного цистеинового остатка в тиоFab, а мутация в двух сайтах приводит к включению двух цистеиновых остатков в тиоMab, что обусловлено димерной природой антитела IgG.

Сконструированными на основе цистеина анти-CD79b антителами согласно изобретению являются моноклональные антитела, гуманизированные или химерные моноклональные антитела, и антигенсвязывающие фрагменты антител, гибридные полипептиды и аналоги, которые преимущественно связываются с клеточно-ассоциированными полипептидами CD79b. Сконструированное на основе цистеина антитело может альтернативно включать антитело, содержащее цистеин в описанных здесь положениях антитела или Fab, и такая конструкция может быть получена после конструирования последовательности и/или отбора антител, избегая необходимости модификации родительского антитела, где такое конструирование проводят путем создания антител методом фагового представления и отбора таких антител или посредством конструирования каркасных последовательностей и константных областей легкой и/или тяжелой цепи *de novo*. Сконструированное на основе цистеина антитело содержит одно или несколько свободных цистеиновых аминокислот, имеющих величину тиоловой реактивности в пределах 0,6-1,0, 0,7-1,0 или 0,8-1,0. Свободная цистеиновая аминокислота представляет собой цистеиновый остаток, который был введен в родительское антитело и не является частью дисульфидного мостика. Сконструированное на основе цистеина антитело может быть использовано для присоединения цитотоксических и/или визуализирующих соединений в сайте введенного цистеина посредством, например, малеимида или галогенацетила. Нуклеофильная реактивность тиоловых функциональных групп остатка Cys с малеимидной группой приблизительно в 1000 раз выше, чем реактивность любых других функциональных групп аминокислот в белке, таких как

аминогруппа лизиновых остатков или N-концевая аминогруппа. Тиол-специфическая функциональная группа в йодацетильных и малеимидных реагентах может реагировать с аминогруппами, но при более высоком pH (>9,0), и такая реакция занимает больше времени (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

В одном из аспектов изобретения, сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело согласно изобретению содержит цистеин, введенный в любое одно из нижеследующих положений, где положения в легкой цепи пронумерованы по Кэбату (см. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), а положения в тяжелой цепи пронумерованы в соответствии с Европейской системой нумерации (включая Fc-область) (см. Kabat et al. (1991), см. выше), где константная область легкой цепи, представленная и подчеркнутая на фигурах 24A, 25A, 26A, 27A, 28, 48A и 49A, начинается с положения 109 (нумерация по Кэбату), а константная область тяжелой цепи, представленная и подчеркнутая на фигурах 24B, 25B, 26B, 27B, 28B, 48B и 49B, начинается с положения 118 (в соответствии с Европейской системой нумерации (EU)). Такими положением может быть также положение в последовательной нумерации аминокислот полноразмерной легкой цепи или тяжелой цепи, представленной на фигурах 24-28, 48 и 49. В одном из вариантов изобретения анти-CD79b антитело содержит цистеин, введенный в LC-V205C (номер по Кэбату: Val 205; порядковый номер 209 на фигуре 27A и 49A означает Cys, введенный в это положение). Цистеин, введенный в легкую цепь, показан жирным шрифтом и подчеркнут двойной чертой на фигурах 27A и 49A. В одном из вариантов изобретения анти-CD79b антитело содержит цистеин, введенный в HC-A118C (номер EU: Ala 118; номер по Кэбату 114; порядковый номер 118 на фигуре

24В, 25В, 26В, 28В или 48В означает Cys, введенный в этом положении). Цистеин, введенный в тяжелую цепь, показан жирным шрифтом и подчеркнут двойной чертой на фигурах 24В, 25В, 26В, 28В или 48В. В одном из вариантов изобретения анти-CD79b антитело содержит цистеин, введенный в Fc-S400C (номер EU: Ser 400; номер по Кэбату 396; порядковый номер 400 на фигурах 24В, 25В, 26В, 28В или 48В означает Cys, введенный в этом положении). В других вариантах изобретения цистеин, введенный в тяжелую цепь (включая Fc-область), присутствует в любом одном из следующих положений (в соответствии с нумерацией по Кэбату, а в скобках в соответствии с нумерацией EU): 5, 23, 84, 112, 114 (номер по EU 118), 116 (номер по EU 120), 278 (номер по EU 282), 371 (номер по EU 375) или 396 (номер по EU 400). Таким образом, модификациями аминокислот в этих положениях для родительского гуманизированного анти-CD79b антитела согласно изобретению являются: V5C, A23C, A84C, S112C, A114C (номер по EU A118C), T116C (номер по EU T120C), V278C (номер по EU V282C), S371C (номер по EU S375C) или S396C (номер по EU S400C). Таким образом, модификациями аминокислот в этих положениях для родительского химерного анти-CD79b антитела согласно изобретению являются: Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (номер по EU A118C), T116C (номер по EU T120C), V278C (номер по EU V282C), S371C (номер по EU S375C) или S396C (номер по EU S400C). Таким образом, модификациями аминокислот в этих положениях для родительского антитела против CD79b собакоподобных обезьян (anti-synoCD79b) согласно изобретению являются: Q5C, T23C, S84C, S112C, A114C (номер по EU A118C), T116C (номер по EU T120C), V278C (номер по EU V282C), S371C (номер по EU S375C) или S396C (номер по EU S400C). В других вариантах изобретения цистеином, введенным в легкую цепь, является цистеин в любом из следующих положений: (в соответствии с нумерацией по Кэбату): 15, 110, 114, 121, 127, 168, 205. Таким образом, модификациями аминокислот в этих положениях для родительского гуманизированного анти-CD79b антитела согласно изобретению являются: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, или V205C. Таким образом, модификациями аминокислот в этих положениях для родительского химерного анти-CD79b антитела согласно изобретению являются: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C или V205C. Таким образом, модификациями аминокислот в этих положениях для родительского анти-synoCD79b антитела согласно изобретению являются: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C или V205C.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение включает сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело, содержащее одну или несколько свободных цистеиновых аминокислот, где указанное сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело связывается с полипептидом CD79b, и где указанное антитело получают способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского анти-CD79b антитела цистеином, где указанное родительское антитело содержит по меньшей мере одну последовательность HVR, выбранных из:

- (a) HVR-L1, содержащей последовательность A1-A15, где A1-A15 представляет собой KASQSVDDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) или KASQSVDDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 137);
- (b) HVR-L2, содержащей последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой AASNLES (SEQ ID NO: 132);
- (c) HVR-L3, содержащей последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133);
- (d) HVR-H1, содержащей последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134);
- (e) HVR-H2, содержащей последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой

GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135), и

(f) HVR-H3, содержащей последовательность F1-F10, где F1-F10 представляет собой TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136) или TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к сконструированному на основе цистеина анти-CD79b антителу, содержащему аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% и, альтернативно, по меньшей мере примерно на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности сконструированного на основе цистеина антитела, имеющего полноразмерную последовательность, описанную в настоящей заявке, или аминокислотной последовательности сконструированного на основе цистеина антитела, не содержащего сигнального пептида, и описанного в настоящей заявке.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к выделенному сконструированному на основе цистеина анти-CD79b антителу, содержащему аминокислотную последовательность, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, гибридизирующейся с комплементом молекулы ДНК, кодирующей (а) сконструированное на основе цистеина антитело, имеющее полноразмерную аминокислотную последовательность, описанную в настоящей заявке, (b) аминокислотную последовательность сконструированного на основе цистеина антитела, не содержащую сигнального пептида, и описанную в настоящей заявке, (с) внеклеточный домен трансмембранного белка сконструированного на основе цистеина антитела, содержащего или не содержащего сигнальный пептид, как описано в настоящей заявке, (d) аминокислотную последовательность, кодируемую любыми описанными здесь последовательностями нуклеиновой кислоты, или (е) любой другой конкретно определенный фрагмент полноразмерной аминокислотной последовательности сконструированного на основе цистеина антитела, описанного в настоящей заявке.

В своем конкретном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному сконструированному на основе цистеина анти-CD79b антителу, не содержащему N-концевой сигнальной последовательности и/или иницирующего метионина, и кодируемому нуклеотидной последовательностью, которая кодирует такую аминокислотную последовательность, описанную в настоящей заявке. В настоящей заявке также описаны способы получения таких антител, где указанные способы включают культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, включающий соответствующую кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты, в условиях, подходящих для экспрессии указанного сконструированного на основе цистеина антитела, и выделение сконструированного на основе цистеина антитела из клеточной культуры.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к выделенному сконструированному на основе цистеина анти-CD79b антителу, которое представляет собой антитело с делетированным трансмембранным доменом или с инактивированным трансмембранным доменом. В настоящей заявке также описаны способы получения таких антител, где указанные способы включают культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, включающий соответствующую кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты, в условиях, подходящих для экспрессии указанного сконструированного на основе цистеина антитела, и выделение сконструированного на основе цистеина антитела из клеточной культуры.

В других своих аспектах настоящее изобретение относится к выделенным химерным и сконструированным на основе цистеина анти-CD79b антителам, содержащим любое из описанных здесь сконструированных на основе цистеина антител, связанных с

гетерологичным полипептидом (не являющимся CD79b). Примеры таких химерных антител содержат любое из описанных здесь сконструированных на основе цистеина антител, связанных с гетерологичным полипептидом, таким как, например, последовательность эпитопной метки или Fc-область иммуноглобулина.

5 Сконструированным на основе цистеина анти-CD79b антителом может быть моноклональное антитело, фрагмент антитела, химерное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело или антитело, которое конкурентно ингибирует связывание антитела против полипептида CD79b с его соответствующим антигенным эпитопом. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно,
10 конъюгированы с рост-ингибирующим агентом или с цитотоксическим средством, таким как токсин, включая, например, ауристатин, майтанзиноид, производное доластатина или калихеамицин, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или т.п. Антитела согласно изобретению могут быть, но необязательно, продуцированы в клетках СНО или в бактериальных клетках, и предпочтительно эти
15 антитела ингибируют рост или пролиферацию клеток, с которыми они связаны, или индуцируют гибель таких клеток. Антитела согласно изобретению, используемые в диагностических целях, могут быть детектируемо помечены, присоединены к твердому носителю или т.п.

В других своих аспектах настоящее изобретение относится к векторам, содержащим
20 ДНК, кодирующую любое из описанных здесь анти-CD79b антител и анти-CD79b антител, сконструированных на основе цистеина. Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим любой из указанных векторов. Так, например, клетками-хозяевами могут быть клетки СНО, клетки *E. coli* или клетки дрожжей. Настоящее изобретение также относится к способу получения любого из
25 описанных здесь полипептидов, и такой способ включает культивирование клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии нужного полипептида, и выделение нужного полипептида из клеточной культуры.

Сконструированные на основе цистеина антитела могут быть использованы для лечения рака, и такими антителами являются антитела, специфичные к рецепторам
30 клеточной поверхности и трансмембранным рецепторам, и к опухолеассоциированным антигенам (ТАА). Такие антитела могут быть использованы в качестве «оголенных» антител (неконъюгированных с лекарственным средством или с молекулой-меткой) или конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (ADC). Сконструированные на основе цистеина антитела согласно изобретению могут быть сайт-специфически и
35 функционально присоединены к реагенту, реагирующему с тиолом. Реагирующим с тиолом реагентом может быть многофункциональный линкерный реагент, реагент-метка для захвата, реагент-флуорофор и промежуточное соединение «лекарственное средство-линкер». Сконструированное на основе цистеина антитело может быть помечено детектируемой меткой, иммобилизовано на твердофазном носителе и/или
40 конъюгировано с молекулой лекарственного средства. Реакционная способность тиоловой группы может быть сообщена любому антителу, где могут быть сделаны замены аминокислот реакционноспособными цистеиновыми аминокислотами в областях легких цепей, выбранных из следующих областей аминокислотных последовательностей: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210; и в областях
45 тяжелых цепей, выбранных из следующих областей аминокислотных последовательностей: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121, и в Fc-области на участках, выбранных из H270-H280, H366-H376, H391-401, где нумерация положений аминокислот начинается с положения 1 по системе нумерации Кэбата (Kabat

et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) и далее продолжается, как описано в WO2006034488; US 2007/0092940. Реакционная способность тиоловой группы может быть сообщена некоторым доменам антитела, таким как константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Цистеиновые замены, дающие величину реакционной способности тиоловой группы 0,6 и выше, могут быть сделаны в константных доменах тяжелой цепи α , δ , ϵ , γ и μ интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая подклассы IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Такие антитела и их применение описаны в WO2006/034488, US 2007/0092940.

Сконструированные на основе цистеина антитела согласно изобретению предпочтительно сохраняют антигенсвязывающую способность их родительских аналогов дикого типа. Таким образом, сконструированные на основе цистеина антитела обладают способностью связываться, предпочтительно специфически, с антигенами. Такими антигенами являются, например, опухолеассоциированные антигены (ТАА), белки рецепторов клеточной поверхности и другие молекулы клеточной поверхности, трансмембранные белки, сигнальные белки, факторы регуляции выживаемости клеток, факторы регуляции пролиферации клеток, молекулы, ассоциированные с развитием или дифференцировкой ткани (например, молекулы, которые, как известно или как предполагается, участвуют в таком развитии или в такой дифференцировке), лимфокины, цитокины, молекулы, участвующие в регуляции клеточного цикла, молекулы, участвующие в образовании сосудов, и молекулы, ассоциированные с ангиогенезом (например, молекулы, которые, как известно или как предполагается, участвуют в таком ангиогенезе). Опухлеассоциированным антигеном может быть фактор дифференцировки кластера (то есть белок CD, включая, но не ограничиваясь им, CD79b). Сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела согласно изобретению сохраняют антигенсвязывающую способность родительских аналогов анти-CD79b антитела. Таким образом, сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела согласно изобретению обладают способностью связываться, предпочтительно специфически, с антигенами CD79b, включая изоформы бета и/или альфа человеческого анти-CD79b антитела, если указанные антигены экспрессируются на поверхности клеток, включая, но не ограничиваясь ими, В-клетки.

В одном из аспектов изобретения, антитела согласно изобретению могут быть конъюгированы с любой молекулой-меткой, которая может быть ковалентно связана с антителом посредством реакционноспособной молекулы, активированной группы или реакционноспособной тиоловой группы цистеина (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). Присоединенная метка может обладать следующими функциями, а именно: (i) продуцирование детектируемого сигнала; (ii) взаимодействие со второй меткой и тем самым модификация детектируемого сигнала, передаваемого первой или второй меткой, например, посредством FRET (переноса флуоресцентной резонансной энергии); (iii) стабилизация взаимодействия или повышение аффинности связывания с антигеном или лигандом; (iv) влияние на подвижность, например, электрофоретическую подвижность или на клеточную проницаемость посредством заряда, гидрофобности, формы или других физических параметров; или (v) образование иммобилизованной молекулы и тем самым модуляция аффинности к лиганду, связывания антитела с антигеном или образования ионных комплексов.

Меченые антитела, сконструированные на основе цистеина, могут быть использованы

в диагностических анализах, например, в целях детекции экспрессии представляющего интерес антигена в конкретных клетках, тканях или в сыворотке. Для применения в диагностических целях указанное антитело обычно метят детектируемой молекулой. Существуют различные метки, которые могут быть по существу подразделены на следующие категории:

Радиоизотопы (радионуклиды), такие как ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{94}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At или ^{213}Bi . Меченные радиоизотопами антитела могут быть использованы в экспериментах по визуализации рецепторов-мишеней. Антитело может быть помечено реагентами-лигандами, которые связываются, либо образуют хелатный комплекс или какой-либо другой комплекс с металлом-радиоизотопом, где указанный реагент способен реагировать с тиолом цистеинов, введенных в указанное антитело, в соответствии с методами, описанными в Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al. Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Хелатообразующими лигандами, которые могут образовывать комплекс с ионами металла, являются DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA и TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Радионуклиды могут быть присоединены посредством образования комплекса с конъюгатами “антитело-лекарственное средство” согласно изобретению (Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146).

Линкерные реагенты, такие как DOTA-малеимид (4-малеимидобутирамидобензил-DOTA), могут быть получены посредством реакции взаимодействия аминокбензил-DOTA с 4-малеимидомасляной кислотой (Fluka), активированной изопропилхлорформиатом (Aldrich), в соответствии с процедурой, описанной Axworthy et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807). DOTA-малеимидные реагенты реагируют со свободными цистеиновыми аминокислотными остатками антител, сконструированных на основе цистеина, и способствуют образованию комплекса металл-лиганд на указанном антителе (Lewis et al. (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86). Реагенты для мечения хелатообразующего линкера, такие как DOTA-NHS (моно-N-гидрокси-сукцинимидоэфир 1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты), являются коммерчески доступными (Macrocyclics, Dallas, TX). Визуализация рецептора-мишени меченными радионуклидом антителами позволяет идентифицировать активацию пути посредством детекции и количественной оценки прогрессирующей аккумуляции антител в опухолевой ткани (Albert et al. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210). Конъюгированные радиоактивные металлы могут оставаться внутри клеток после деградации лизосом.

Хелатные комплексы с металлом, подходящие для мечения антитела в экспериментах по визуализации, описаны в патентах США 5342606; 5428155; 5316757; 5480990; 5462725; 5428139; 5385893; 5739294; 5750660; 5834456; и в публикациях 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. [0378] 22:387-90; Camera et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis et al. (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110; Verel et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Camera et al. (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646; Ruegg et al. (1990) Cancer Res. 50:4221-4226; Verel et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Lee et al. (2001) Cancer Res. 61:4474-4482; Mitchell, et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112; Kobayashi et al. (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer et al. (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137; DeNardo et al. (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend et al. (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula et al. (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76; Kobayashi et al. (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36; Mardirossian et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli et al. (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20.

Флуоресцентные метки, такие как хелаты, образованные редкоземельными металлами (хелаты, образованные европием), флуоресцеины нескольких типов, включая ФИТЦ, 5-карбоксифлуоресцеин, 6-карбоксифлуоресцеин; родамины нескольких типов, включая TAMRA; данзил; лиссамин; цианины; фикоэритрины; техасский красный и их аналоги.

5 Флуоресцентные метки могут быть конъюгированы с антителами методами, описанными, например, в руководстве *Current Protocols in Immunology*, см. выше. Флуоресцентными красителями и флуоресцентными реагентами-метками являются коммерчески доступные реагенты, поставляемые фирмами Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) и Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

10 Различные метки “фермент-субстрат” являются доступными или описаны в литературе (в патенте США 4275149). Фермент обычно катализирует химическое превращение хромогенного субстрата, которое может быть измерено различными методами. Так, например, фермент может катализировать изменение цвета субстрата, которое может быть измерено спектрофотометрическим методом. Альтернативно фермент может
15 изменять интенсивность флуоресценции или хемилюминесценции субстрата. Методы количественной оценки изменения интенсивности флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат подвергается электронному возбуждению под действием химической реакции, после чего он может излучать свет, который может быть затем измерен (например, на хемилюминометре), или сообщать энергию флуоресцентному
20 акцептору. Примерами ферментативных меток являются люциферазы (например, люцифераза светляка и бактериальная люцифераза; патент США 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малат-дегидрогеназа, уреазы, пероксидазы, такая как пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ), β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахарид-оксидазы (например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-
25 6-фосфат-дегидрогеназа), гетероциклические оксидазы (такие как уриказы и ксантин-оксидазы), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Методы конъюгирования ферментов с антителами описаны в публикациях 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.

30 Примерами комбинаций “фермент-субстрат” являются, например:

(i) пероксидаза хрена (ПХ) с ее субстратом пероксидом водорода, где указанный пероксид водорода окисляет краситель-предшественник (например, ортофенилендиамин (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ));

(ii) щелочная фосфатаза (ЩФ) с ее хромогенным субстратом пара-
35 нитрофенилфосфатом; и

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

40 Специалистам известны и различные другие комбинации “фермент-субстрат”. Общее их описание можно найти в патентах США 4275149 и 4318980.

Метка может быть непосредственно конъюгирована с аминокислотной боковой цепью, с активированной аминокислотной боковой цепью, с антителом, сконструированным на основе цистенина, и т.п. Так, например, антитело может быть конъюгировано с биотином, а любая из меток трех вышеуказанных широких категорий
45 может быть конъюгирована с авидином или со стрептавидином, или наоборот. Биотин селективно связывается со стрептавидином, и таким образом, данная метка может быть опосредованно конъюгирована с антителом. Альтернативно, для осуществления непрямого конъюгирования метки с полипептидным вариантом, такой полипептидный

вариант конъюгируют с небольшим гаптенем (например, дигоксином), а одну из меток вышеупомянутых различных типов конъюгируют с антигаптенным полипептидным вариантом (например, с антителом против дигоксина). Таким образом, может быть достигнуто опосредованное конъюгирование метки с полипептидным вариантом

5 (Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

Антитело согласно изобретению может быть использовано в любом известном аналитическом методе, таком как ELISA, в анализах на конкурентное связывание, в прямых и непрямых “сэндвич”-анализах и в анализах, проводимых путем иммунопреципитации (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-

10 158, CRC Press, Inc.).

Детектируемая метка может быть использована для определения локализации, для визуализации и для количественной оценки события связывания или распознавания. Меченые антитела согласно изобретению могут распознавать рецепторы клеточной поверхности. Другим применением детектируемых меченых антител является метод

15 иммунной иммобилизации на сферах, включающий конъюгирование сферы с флуоресцентно меченым антителом и детекцию флуоресцентного сигнала после связывания с лигандом. В аналогичных методах детекции связывания, для измерения и детекции взаимодействий антитела с антигеном применяется эффект поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Детектируемые метки, такие как флуоресцентные красители и хемилюминесцентные красители (Briggs et al. (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids", *J. Chem. Soc, Perkin-Trans. 1*:1051-1058), дают детектируемый сигнал и обычно используются для мечения антител, предпочтительно обладающих

25 нижеследующими свойствами, а именно: (i) меченое антитело должно продуцировать сигнал с очень высокой интенсивностью при низком фоновом сигнале, так, чтобы небольшие количества антител могли быть детектированы высокочувствительным методом в бесклеточном или клеточном анализе; и (ii) меченое антитело должно быть фотостабильным, так, чтобы флуоресцентный сигнал мог детектироваться, наблюдаться и регистрироваться без применения значительного уровня оптического отбеливания.

В методах, в которых применяется связывание меченого антитела с клеточными мембранами или с клеточными поверхностями, особенно “живых” клеток, данные метки, предпочтительно (iii) должны иметь хорошую растворимость в воде, что позволяет достичь эффективной концентрации конъюгата и высокой чувствительности

30 детекции, и (iv) должны быть нетоксичными по отношению к “живым” клеткам во избежание нарушения нормальных метаболических процессов в клетках или преждевременной гибели клеток.

Прямая количественная оценка интенсивности флуоресценции клеток и подсчет событий флуоресцентного мечения, например, событий связывания конъюгатов “пептид-краситель” с клеточной поверхностью, могут быть осуществлены на системе FMAT®

40 8100 HTS System (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), которая позволяет проводить автоматическое смешивание и считывание, и нерадиоактивные анализы на “живых” клетках или на сферах (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-204). Применение меченых антител также предусматривает проведение анализов

45 на связывание с рецептором клеточной поверхности, анализов с иммунной иммобилизацией, флуоресцентных твердофазных анализов (FLISA), анализа путем расщепления каспазой (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23;

US 6372907), анализа на апоптоз (Vermees, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51) и анализа на цитотоксичность. Метод флуориметрического анализа на уровне микрообъемов может быть применен для

5 идентификации позитивной или негативной регуляции под действием молекулы, доставленной на клеточную поверхность (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51).

Меченые антитела согласно изобретению могут быть использованы в качестве

10 визуализирующих биологических маркеров и зондов в различных методах и технологиях биомедицины и молекулярной визуализации, таких как (i) MRI (визуализация методом магнитного резонанса); (ii) MicroCT (компьютерная томография); (iii) SPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография); (iv) PET (позитронная эмиссионная томография) Chen et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49; (v)

15 биолюминесценция; (vi) флуоресценция; и (vii) ультразвуковое обследование.

Иммуноскинтиграфия представляет собой способ визуализации, в котором антитела, меченные радиоактивными веществами, вводят животному или человеку, и по изображению определяют место локализации антитела в организме животного или человека (патент США 6528624). Визуализирующие биомаркеры могут быть объективно

20 измерены и оценены, как показатель нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое лечение. Биологическими маркерами могут быть маркеры несколько типов: маркеры типа 0, которые представляют собой природные давно известные маркеры данного заболевания и линейно коррелируют с известными клиническими показателями, например, оценкой

25 воспаления синовия при ревматоидном артрите, проводимой методом ЯМР-томографии; маркеры типа I, которые позволяют детектировать эффект терапевтического лечения в соответствии с действующим механизмом, даже если этот механизм не может быть ассоциирован с клиническим результатом; маркеры типа II, которые действуют как "суррогатные" конечные точки, где изменения в биомаркере или изменения сигнала,

30 поступающего от биомаркера, позволяют предсказывать благоприятный клинический эффект для «подтверждения» целевого ответа, такого как эрозия кости при ревматоидном артрите, измеренная с помощью компьютерной томографии (КТ). Таким образом, с помощью визуализирующих биомаркеров могут быть получены фармакодинамические (ФД) терапевтические данные, относящиеся (i) к экспрессии

35 белка-мишени, (ii) к связыванию терапевтического средства с белком-мишенью, то есть к селективности, и (iii) к клиренсу и времени полужизни; а также фармакокинетические данные. Преимуществами *in vivo* визуализирующих биомаркеров по сравнению с лабораторными биологическими маркерами являются: возможность их применения для осуществления неинвазивной обработки, возможность их количественной оценки

40 и применения для обследования всего организма, возможность многократного введения доз и проведения анализов, то есть в различные моменты времени, и возможность применения результатов, полученных в преклинических исследованиях (для мелких животных), для проведения клинических исследований (для человека). В некоторых случаях биологическая визуализация позволяет не проводить ряд экспериментов или

45 свести до минимума количество экспериментов на животных в преклинических исследованиях.

Методы мечення пептидов хорошо известны специалистам. См. Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes,

Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al. (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; 5 Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pflleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; and 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) 10 *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

Пептиды и белки, меченные двумя молекулами, флуоресцентным репортером и гасителем, находящимися в непосредственной близости друг от друга, участвуют в переносе резонансной энергии флуоресценции (FRET). Репортерные группы обычно 15 представляют собой флуоресцентные красители, которые возбуждаются под действием света на определенных длинах волн и переносят энергию на акцептор или гаситель, то есть на группу с соответствующим стоксовым сдвигом, обеспечивающую излучение с максимальной яркостью. Флуоресцентными красителями являются молекулы с более явно выраженной ароматичностью, такие как флуоресцеин и родамин и их производные. 20 Флуоресцентный репортер может быть частично или в значительной степени погашен молекулой-гасителем в интактном пептиде. После расщепления пептида пептидазой или протеазой может наблюдаться детектируемое увеличение интенсивности флуоресценции (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

Меченые антитела согласно изобретению могут быть также использованы в качестве средства для аффинной очистки. В этом способе меченое антитело иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола сефадекс или фильтровальная бумага, методами, хорошо известными специалистам. Иммобилизованное антитело подвергают контакту с образцом, содержащим очищаемый антиген, а затем носитель промывают подходящим 30 растворителем для удаления почти всего материала в образце, за исключением очищаемого антигена, и присоединяют к иммобилизованному полипептидному варианту. И наконец, носитель промывают другим подходящим растворителем, таким как глициновый буфер, pH 5,0, который высвобождает антиген из полипептидного варианта.

Реагенты для мечения обычно имеют реакционноспособные функциональные группы, 35 которые могут реагировать (i) непосредственно с тиолом цистеина антитела, сконструированного на основе цистеина, с образованием меченого антитела, (ii) с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения "линкер-метка" или (iii) с линкерным антителом с образованием меченого антитела.

Реакционноспособными функциональными группами реагентов для мечения являются 40 малеимид, галогенацетил, йодацетамидосукцинимидиловый эфир (например, NHS, N-гидроксисукцинимид), изотиоцианат, сульфонилхлорид, 2,6-дихлортриазинил, пентафторфениловый эфир и фосфорамидит, хотя могут быть также использованы и другие функциональные группы.

Репрезентативной реакционноспособной функциональной группой является N- 45 гидроксисукцинимидоэфир (NHS), в котором карбоксигруппа замещена детектируемой меткой, например, биотином или флуоресцентным красителем. NHS-эфир указанной метки может быть предварительно получен, выделен, очищен и/или охарактеризован, либо он может быть образован *in situ* и подвергнут реакции с нуклеофильной группой

антитела. Обычно карбоксильную форму метки активируют посредством реакции взаимодействия с определенной комбинацией карбодиимидных реагентов, например, с дициклогексилкарбодиимидом, диизопропилкарбодиимидом, или ураниевым реагентом, например, TSTU (тетрафторборатом O-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилурия, HBTU (гексафторфосфатом O-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурия) или HATU (гексафторфосфатом O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурия); и с активатором, таким как 1-гидроксibenзотриазол (HOBT), и N-гидроксисукцинимид, с получением NHS-эфира метки. В некоторых случаях, метка и антитело могут быть связаны посредством *in situ* активации метки и взаимодействия с антителом с получением конъюгата "метка-антитело" в одну стадию. Другими активирующими и связывающими реагентами являются TBTU (гексафторфосфат 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия), TFFH (2-фторгексафторфосфат N,N',N'',N'''-тетраметилурия), PyBOP (гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидинофосфония), EEDQ (2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин), DCC (дициклогексилкарбодиимид); DIPCDI (диизопропилкарбодиимид), MSNT (1-(мезитиле-2-сульфонил)-3-нитро-1H-1,2,4-триазол) и арилсульфонилгалогениды, например, триизопропилбензолсульфонилхлорид.

Соединения «альбумин-связывающий пептид-Fab» согласно изобретению

В одном из аспектов изобретения, антитело согласно изобретению присоединено к альбумин-связывающему белку. Связывание белка плазмы может быть эффективным средством улучшения фармакокинетических свойств короткоживущих молекул.

Альбумин является самым распространенным белком в плазме. Пептиды, связывающиеся с альбумином сыворотки, (ABP), могут изменять фармакодинамику гибридных белков, содержащих активные домены, например, изменять поглощающую способность ткани, ее проницаемость и диффузию. Эти фармакодинамические параметры могут быть модулированы путем специфического отбора соответствующей последовательности пептида, связывающегося с альбумином сыворотки (заявка на патент США 2004/0001827). Ряд альбумин-связывающих пептидов был идентифицирован посредством скрининга методом фагового представления (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). Соединения согласно изобретению включают ABP-последовательности, описанные в работах (i) Dennis et al. (2002) J. Biol Chem. 277:35035-35043, таблицы III и IV, стр. 35038; (ii) в заявке на патент США 20040001827, абзац [0076], SEQ ID NO: 9-22; и (iii) WO 01/45746, стр. 12-13: которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Альбумин-связывающие (ABP)-Fab были сконструированы путем присоединения альбумин-связывающего пептида к С-концу тяжелой цепи Fab в стехиометрическом отношении 1:1 (1 ABP/1 Fab). Было показано, что связывание этих ABP-Fab с альбумином увеличивает время полужизни антитела у кроликов и мышей более чем в 25 раз. Поэтому вышеописанные реакционноспособные остатки Cys могут быть введены в эти ABP-Fab и использованы для сайт-специфического конъюгирования с цитотоксическими лекарственными средствами с последующим проведением исследований на животных *in vivo*.

Репрезентативными последовательностями альбумин-связывающего пептида являются, но не ограничиваются ими, аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 246-250:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 246

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 247

QRLIEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 248

RLIEDICLPRWGCLWEDD SEQ ID NO: 249

DICLPRWGCLW SEQ ID NO: 250

Конъюгаты «антитело-лекарственное средство»

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам или к конъюгатам «антитело-лекарственное средство» (ADC), содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, рост-ингибирующий агент, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (то есть радиоконъюгат). В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способам применения таких иммуноконъюгатов. В одном из аспектов изобретения иммуноконъюгат содержит любое из вышеупомянутых анти-CD79b антител, ковалентно связанных с цитотоксическим средством или с детектируемым агентом.

В одном из аспектов изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению связывается с тем же эпитопом на CD79b, с которым связывается другое антитело против CD79b. В другом варианте изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению связывается с тем же эпитопом на CD79b, с которым связывается Fab-фрагмент моноклонального антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС под номером HB11413 20 июля 1993 г., моноклонального антитела, содержащего переменные домены SEQ ID NO: 10 (фигуры 7A-B) и SEQ ID NO: 14 (фигуры 8A-B), или химерного антитела, содержащего переменный домен антитела, полученного из гибридом HB11413, депонированных в АТСС 20 июля 1993 г., и константные домены от IgG1, или переменные домены моноклонального антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 10 (фигуры 7A-B) и SEQ ID NO: 14 (фигуры 8A-B). В другом варианте изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению связывается с тем же эпитопом на CD79b, с которым связывается другое анти-CD79b антитело (то есть CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), антитело против человеческого CD79b (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

В другом аспекте изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению связывается с эпитопом на CD79b, отличающимся от эпитопа, с которым связывается другое анти-CD79b антитело. В другом варианте изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению связывается с эпитопом на CD79b, отличающимся от эпитопа, с которым связывается Fab-фрагмент моноклонального антитела, полученного из гибридом, депонированных в АТСС под номером HB11413 20 июля 1993 г., моноклонального антитела, содержащего переменные домены SEQ ID NO: 10 (фигуры 7A-B) и SEQ ID NO: 14 (фигуры 8A-B), или химерного антитела, содержащего переменный домен антитела, полученного из гибридом HB11413, депонированных в АТСС 20 июля 1993 г., и константные домены от IgG1, или переменные домены моноклонального антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 10 (фигуры 7A-B) и SEQ ID NO: 14 (фигуры 8A-B). В другом варианте изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению связывается с эпитопом на CD79b, отличающимся от эпитопа, с которым связывается другое анти-CD79b антитело (то есть CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), антитело против человеческого CD79b (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

В другом аспекте изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению отличается от (то есть не является им) Fab-фрагмента моноклонального антитела,

полученного из гибридом, депонированных в АТСС под номером HB11413 20 июля 1993 г., моноклонального антитела, содержащего вариабельные домены SEQ ID NO: 10 (фигуры 7А-В) и SEQ ID NO: 14 (фигуры 8А-В), или химерного антитела, содержащего вариабельный домен антитела, полученного из гибридом HB11413, депонированных в АТСС 20 июля 1993 г., и константные домены от IgG1, или вариабельные домены моноклонального антитела, содержащего последовательности SEQ ID NO: 10 (фигуры 7А-В) и SEQ ID NO: 14 (фигуры 8А-В). В другом аспекте изобретения, анти-CD79b антитело согласно изобретению отличается от (то есть не является им) Fab-фрагмента другого анти-CD79b антитела (то есть CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), антитела против человеческого CD79b (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

В одном из аспектов изобретения, антитело согласно изобретению специфически связывается с CD79b животного первого вида, но специфически не связывается с CD79b животного другого вида. В одном из вариантов изобретения животным первого вида является человек и/или примат (например, собакоподобная обезьяна), а животным второго вида является животное семейства мышинных (например, мышь) и/или животное семейства собачьих. В одном из вариантов изобретения животным первого вида является человек. В одном из вариантов изобретения животным первого вида является примат, например, собакоподобная обезьяна. В одном из вариантов изобретения, животным второго вида является животное семейства мышинных, например, мышь. В одном из вариантов изобретения животным второго вида является животное семейства собачьих.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к композициям, содержащим одно или несколько антител согласно изобретению и носитель. В одном из вариантов изобретения указанным носителем является фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим анти-CD79b антитело согласно изобретению.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту согласно изобретению.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту или вектор согласно изобретению. Вектором может быть вектор любого типа, например, рекомбинантный вектор, такой как экспрессионный вектор. При этом могут быть использованы клетки-хозяева любого вида. В одном из вариантов изобретения клетками-хозяевами являются прокариотические клетки, например, *E. coli*. В одном из вариантов изобретения клетками-хозяевами являются эукариотические клетки, например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способам получения антитела согласно изобретению. Так, например, настоящее изобретение относится к способу получения анти-CD79b антитела (которое, как определено в настоящей заявке, включает полноразмерную последовательность и его фрагменты), где указанный способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора согласно изобретению, кодирующего указанное антитело (или его фрагмент), и выделение указанного антитела.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к промышленному изделию, содержащему контейнер, и композиции, содержащейся в данном контейнере, где указанная композиция содержит одно или несколько анти-CD79b антител согласно

изобретению. В одном из вариантов изобретения указанная композиция содержит нуклеиновую кислоту согласно изобретению. В одном из вариантов изобретения композиция, содержащая антитело, также содержит носитель, который, в некоторых вариантах изобретения, является фармацевтически приемлемым. В одном из вариантов изобретения промышленное изделие согласно изобретению также содержит инструкции по введению композиции (например, антитела) индивидууму.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к набору, содержащему первый контейнер, включающий композицию, содержащую одно или несколько анти-CD79b антител согласно изобретению; и второй контейнер, содержащий буфер. В одном из вариантов изобретения указанный буфер является фармацевтически приемлемым. В одном из вариантов изобретения композиция, содержащая антитело-антагонист, также включает носитель, который в некоторых вариантах изобретения является фармацевтически приемлемым. В одном из вариантов изобретения набор также содержит инструкции по введению композиции (например, антитела) индивидууму.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению анти-CD79b антитела согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство. В одном из вариантов изобретения рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению нуклеиновой кислоты согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство. В одном из вариантов изобретения рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению экспрессионного вектора согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство. В одном из вариантов изобретения рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению клетки-

хозяина согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство. В одном из вариантов изобретения рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению промышленного изделия согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство. В одном из вариантов изобретения рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к применению набора согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство. В одном из вариантов изобретения рак, опухоль и/или клеточно-пролиферативное расстройство выбраны из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста клеток, экспрессирующих CD79b, где указанный способ включает контактирование указанных клеток с антителом согласно изобретению, приводящее к ингибированию роста указанных клеток. В одном из вариантов изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу терапевтического лечения млекопитающего, имеющего раковую опухоль, содержащую клетки, экспрессирующие CD79b, где указанный способ включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела согласно изобретению, и тем самым эффективное лечение указанного млекопитающего. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения клеточно-пролиферативного расстройства, ассоциированного с

повышенным уровнем экспрессии CD79b, где указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела согласно изобретению, и тем самым эффективное лечение или предупреждение указанного клеточно-пролиферативного расстройства. В одном из вариантов изобретения указанным клеточно-пролиферативным расстройством является рак. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста клеток, рост которых по меньшей мере частично зависит от рост-потенцирующего действия CD79b, где указанный способ включает контактирование указанных клеток с эффективным количеством антитела согласно изобретению, и тем самым ингибирование роста указанных клеток. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу терапевтического лечения опухоли у млекопитающего, рост которой по меньшей мере частично зависит от рост-потенцирующего действия CD79b, где указанный способ включает контактирование указанных клеток с эффективным количеством антитела согласно изобретению, и тем самым эффективное лечение указанной опухоли. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей описанный здесь иммуноконъюгат, приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент. В одном из вариантов изобретения указанное раковое заболевание выбрано из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга. В одном из вариантов изобретения пациенту вводят цитотоксическое средство в комбинации с соединением-конъюгатом «антитело-лекарственное средство».

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации В-клеток, включающему обработку клеток иммуноконъюгатом, содержащим антитело согласно изобретению, в условиях, благоприятствующих связыванию иммуноконъюгата с CD79b. В одном из вариантов изобретения заболевание, ассоциированное с пролиферацией В-клеток, выбрано из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга. В одном из вариантов изобретения В-клеткой является ксенотрансплантат. В одном из вариантов изобретения указанную обработку проводят *in vitro*. В одном из вариантов изобретения указанную обработку проводят *in vivo*.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу определения

присутствия CD79b в образце, предположительно содержащем CD79b, где указанный способ включает обработку указанного образца антителом согласно изобретению, и определение уровня связывания указанного антитела с CD79b в указанном образце, где уровень связывания указанного антитела с CD79b в указанном образце является

5 показателем присутствия указанного белка в указанном образце. В одном из вариантов изобретения указанным образцом является биологический образец. В другом варианте изобретения указанный биологический образец содержит В-клетки. В одном из вариантов изобретения биологический образец берут у млекопитающего, страдающего или

10 предположительно страдающего В-клеточным расстройством и/или В-клеточно-пролиферативным расстройством, включая, но не ограничиваясь ими, лимфому, неходжкинскую лимфому (НХЛ), агрессивную НХЛ, рецидивирующую агрессивную НХЛ, рецидивирующую бессимптомную НХЛ, не поддающуюся лечению НХЛ, не поддающуюся лечению бессимптомную НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ),

15 острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфому клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу диагностики клеточно-пролиферативного расстройства, ассоциированного с увеличением числа клеток, таких как В-клетки, экспрессирующие CD79b, где указанный способ включает

20 контактирование тестируемых клеток в биологическом образце с любыми из вышеупомянутых антител; определение уровня антитела, связанного с тестируемыми клетками в образце, путем детекции связывания антитела с CD79b; и сравнение с уровнем антитела, связанного с клетками, в контрольном образце, где уровень связанного антитела нормализуют по числу CD79b-экспрессирующих клеток в тестируемых и контрольных образцах, и где более высокий уровень связанного антитела в тестируемом

25 образце, по сравнению с контрольным образцом, указывает на присутствие клеточно-пролиферативного расстройства, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD79b.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу детекции растворимого CD79b в крови или в сыворотке, где указанный способ включает

30 контактирование тестируемого образца крови или сыворотки, взятого у млекопитающего, предпочтительно страдающего В-клеточно-пролиферативным расстройством, с анти-CD79b антителом согласно изобретению, и детекцию увеличения уровня растворимого CD79b в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом крови или сыворотки, взятым у здорового млекопитающего. В одном из

35 вариантов изобретения указанный способ детекции может быть применен для диагностики В-клеточно-пролиферативного расстройства, ассоциированного с повышением уровня растворимого CD79b в крови или сыворотке млекопитающего.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу связывания антитела согласно изобретению с клеткой, экспрессирующей CD79b, где указанный

40 способ включает контактирование указанной клетки с антителом согласно изобретению. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В одном из вариантов изобретения указанное антитело конъюгировано с рост-ингибирующим агентом.

Способы согласно изобретению могут быть применены для лечения любого

45 подходящего патологического состояния, например, состояния, при котором клетки и/или ткани экспрессируют CD79b. В одном из вариантов изобретения, в способе согласно изобретению, клеткой-мишенью является гемопоэтическая клетка. Так, например, гемопоэтической клеткой может быть клетка, выбранная из группы,

состоящей из лимфоцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов и природных клеток-киллеров. В одном из вариантов изобретения, в способе согласно изобретению, клеткой-мишенью является В-клетка или Т-клетка. В одном из вариантов изобретения, в способе согласно изобретению, клеткой-мишенью является раковая клетка. Так, например,

5 раковыми клетками могут быть клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток лимфомы, лейкоза или миеломы.

Способы согласно изобретению могут также включать дополнительные стадии обработки. Так, например, в одном из вариантов изобретения указанный способ также включает стадию, в которой клетку-мишень и/или ткань-мишень (например, раковую

10 клетку) облучают или обрабатывают химиотерапевтическим средством.

Как описано в настоящей заявке, CD79b представляет собой сигнальный компонент В-клеточного рецептора. В соответствии с этим, в одном из вариантов способов согласно изобретению, указанной клеткой-мишенью (например, раковой клеткой) является клетка, в которой экспрессируется CD79b, по сравнению с клеткой, в которой не

15 экспрессируется CD79b. В другом варианте изобретения указанной клеткой-мишенью является раковая клетка, в которой наблюдается повышенный уровень экспрессии CD79b, по сравнению с нормальной нераковой клеткой ткани того же типа. В одном из вариантов изобретения, способ согласно изобретению направлен на уничтожение клетки-мишени.

В других своих аспектах настоящее изобретение относится к векторам, содержащим ДНК, кодирующую любое из описанных здесь антител. Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим любой такой вектор. Так, например, клетками-хозяевами могут быть клетки СНО, клетки *E. coli* или дрожжевые клетки. Настоящее изобретение также относится к способу получения любого из описанных

25 здесь антител, где указанный способ включает культивирование клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии нужного антитела, и выделение нужного антитела из клеточной культуры.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к рассматриваемой композиции, содержащей описанное здесь анти-CD79b антитело в комбинации с

30 носителем. Указанным носителем является, но необязательно, фармацевтически приемлемый носитель.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению описанного здесь антитела против полипептида CD79b в целях приготовления лекарственного средства для лечения состояния, которое является восприимчивым к антителу против

35 полипептида CD79b.

Другим аспектом настоящего изобретения является композиция, содержащая смесь соединений «антитело-лекарственное средство» формулы I, где средняя загрузка лекарственного средства на антитело составляет примерно 2-5 или примерно 3-4.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение ADC формулы I, смесь соединений ADC формулы I или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент.

40

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации, содержащей соединение ADC формулы I и второе соединение, обладающее

45 противораковыми или другими терапевтическими свойствами.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к способу предотвращения или ингибирования пролиферации опухолевых или раковых клеток, где указанный способ включает обработку клеток конъюгатом «антитело-лекарственное средство»

формулы I или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом в количестве, эффективном для предотвращения или ингибирования пролиферации опухолевых или раковых клеток.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей ADC формулы I.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к промышленным изделиям, то есть к наборам, содержащим конъюгат «антитело-лекарственное средство», контейнер, а также вкладыш в упаковку или этикетку с инструкцией по лечению.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу получения соединения-конъюгата «антитело-лекарственное средство» формулы 1, где указанный способ включает стадии: (a) реакции взаимодействия цистеиновой группы, введенной в сконструированное на основе цистеина антитело, с линкерным реагентом, с образованием промежуточного соединения антитело-линкер Ab-L; и (b) реакции взаимодействия Ab-L с активированной молекулой лекарственного средства D с образованием конъюгата «антитело-лекарственное средство»; или стадии: (c) реакции взаимодействия нуклеофильной группы молекулы лекарственного средства с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения «лекарственное средство-линкер» D-L; и (d) реакции взаимодействия D-L с цистеиновой группой, введенной в сконструированное на основе цистеина антитело с образованием конъюгата «антитело-лекарственное средство».

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к анализу для детекции раковых клеток, включающему: (a) обработку клеток конъюгатом «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» и (b) определение степени связывания соединения-конъюгата «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» с указанными клетками.

A. Анти-CD79b антитела

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителам, которые могут быть применены здесь в качестве терапевтических средств. Репрезентативными антителами являются поликлональные, моноклональные, гуманизированные, биспецифические и гетероконъюгированные антитела.

1. Поликлональные антитела

Поликлональные антитела предпочтительно вырабатываются у животных после множества подкожных (s.c.) или внутрибрюшинных (i.p.) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Они могут использоваться для конъюгирования соответствующего антигена (а в частности, если используются синтетические пептиды) с белком, который является иммуногенным для видов, подвергаемых иммунизации. Так, например, указанный антиген может быть конъюгирован с гемоцианином лимфы улитки (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или соевым ингибитором трипсина с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например, малеимидобензоилсульфосукцинимидоэфира (конъюгированного посредством цистеиновых остатков), N-гидроксисукцинимидоэфира (посредством лизиновых остатков), глутаральдегида, ангидрида янтарной кислоты, SOCl_2 , или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 представляют собой различные алкильные группы.

Животных иммунизируют антигеном, иммуногенными конъюгатами или дериватами путем объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и путем

подкожной инъекции раствора во множество участков. Через месяц животных повторно иммунизируют во множество участков путем подкожной инъекции 1/5-1/10 от первоначального количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда.

- Через 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку на титр антител. Затем животных повторно иммунизируют до достижения плато титра. Конъюгаты могут быть также получены в рекомбинантной клеточной культуре в виде гибридных белков. Кроме того, для усиления иммунного ответа могут быть также использованы агрегирующие агенты, такие как квасцы.

2. Моноклональные антитела

- Моноклональные антитела могут быть получены с применением гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al. *Nature*, 256:495 (1975), либо они могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (патент США № 4816567).

- Для получения гибридом мышь или другое подходящее животное-хозяина, такое как хомячок, иммунизируют, как описано выше, для вырабатывания у них лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, специфически связывающиеся с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют и подвергают слиянию с миеломными клетками с использованием подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, в результате чего образуются гибридомные клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

- Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и культивируют в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, ингибирующих рост или выживание неслитых родительских миеломных клеток (также называемых «партнером по слиянию»). Так, например, если родительские миеломные клетки не содержат фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), то селективная культуральная среда для получения гибридом обычно включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда НАТ), то есть вещества, предупреждающие рост HGPRT-дефицитных клеток.

- Предпочтительными миеломными клетками, называемыми партнерами по слиянию, являются клетки, которые способны подвергаться эффективному слиянию, поддерживать стабильное продуцирование высоких уровней антител указанными выбранными антитело-продуцирующими клетками и являются чувствительными к селективной среде, на которой проводят отбор на неслитые родительские клетки. Предпочтительными миеломными клеточными линиями являются мышинные миеломные линии, такие как клеточные линии, происходящие от клеток мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, имеющихся в институте Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и клетки SP-2 и их производные, например, клетки X63-Ag8-653, имеющиеся в Американской коллекции типовых культур, Manassas, Virginia, USA. Для продуцирования человеческих моноклональных антител также используются человеческие миеломные клеточные линии и гетеромиеломные клеточные линии «мышь-человек» (Kozbor J. *Immunol.*, 133:3001 (1984) & Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

- Культуральную среду для роста гибридомных клеток анализируют на продуцирование моноклональных антител против антигена. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками, определяют, предпочтительно, путем иммунопреципитации или путем проведения *in vitro* анализа на связывание, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть, например,

определена с помощью анализа Скэтчарда, описанного Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела с нужной специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы 5 путем проведения процедур лимитирующего разведения и культивированы стандартными методами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящими культуральными средами, предназначенными для достижения данной цели, являются, например, среда D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки могут быть выращены *in vivo* в качестве асцитных опухолей 10 у животных, например, путем *i.p.* инъекции этих клеток мышам.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки путем проведения стандартных процедур очистки антител, таких как, например, аффинная хроматография (например, на белке А или на G-белке-сефарозе), или ионнообменная хроматография, 15 хроматография на гидроксипатитах, гель-электрофорез, диализ и т.п.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована в соответствии со стандартными процедурами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). 20 Предпочтительным источником такой ДНК служат гибридомные клетки. После выделения эта ДНК может быть встроена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или миеломные клетки, которые в иных случаях не продуцируют белок антитела, в результате чего в этих рекомбинантных клетках- 25 хозяевах синтезируются моноклональные антитела. Обсуждение рекомбинантной экспрессии антитело-кодирующей ДНК в бактериях можно найти в статьях Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

В другом варианте изобретения моноклональные антитела или фрагменты антител 30 могут быть выделены из фаговых библиотек антител, созданных методами, описанными McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). В работе Clackson et al. *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) описано выделение мышинных и человеческих антител, соответственно, с использованием фаговых библиотек. В более поздних публикациях описано продуцирование высокоаффинных (порядка нМ) 35 человеческих антител посредством перестановки генов цепей антитела (Marks et al. *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также путем комбинированного инфицирования и рекомбинации *in vivo*, применяемой в качестве стратегии для конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al. *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методы являются приемлемой альтернативой традиционной 40 гибридомной технологии получения моноклональных антител, применяемой для выделения моноклональных антител.

ДНК, кодирующая антитело, может быть модифицирована для продуцирования полипептидов химерных или гибридных антител, например, путем замены последовательности, кодирующей константные домены (C_H и C_L) тяжелой цепи и легкой 45 цепи человеческого антитела, гомологичными последовательностями мышинных антител (патент США № 4816567 и Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984), или путем присоединения иммуноглобулин-кодирующей последовательности ко всей кодирующей последовательности (или ее части) для неиммуноглобулинового

полипептида (гетерологичного полипептида). Такие последовательности неиммуноглобулиновых полипептидов используют для замены константных доменов антитела, либо их используют для замены переменных доменов одного антигенсвязывающего сайта антитела для создания химерного двухвалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий сайт, обладающий специфичностью к одному антигену, и другой антигенсвязывающий сайт, обладающий специфичностью к другому антигену.

3. Человеческие и гуманизированные антитела

Анти-CD79b антитела согласно изобретению могут также содержать

гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих антител (например, мышинных антител) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, происходящую от нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированными антителами являются человеческие иммуноглобулины (антитело реципиента), в которых остатки, происходящие от гипервариабельной области (CDR) данного антитела-реципиента, заменены остатками, происходящими от гипервариабельной области (CDR) нечеловеческого антитела (донорного антитела), такого как мышинное антитело, крысиное антитело или кроличье антитело, обладающее нужной специфичностью, аффинностью и связывающей способностью. В некоторых случаях остатки каркасной области (Fv) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками.

Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, не обнаруженные в антителе реципиента или в «импортных» последовательностях CDR или каркасной области. В общих чертах, гуманизированное антитело может содержать в основном все или по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все или почти все области CDR соответствуют областям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или почти все FR представляют собой FR с человеческой иммуноглобулиновой консенсусной последовательностью. Гуманизированное антитело также содержит, но необязательно, по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно области человеческого иммуноглобулина [Jones et al. (1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al. (1998) *Nature* 332:323-329 и Presta *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Методы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны специалистам.

Вообще говоря, гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, не являющегося человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют «импортными» остатками, которые обычно берут из «импортного» переменного домена. Гуманизация может быть осуществлена в основном методом Винтера (Winter) и сотрудниками [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)], путем замены последовательностей CDR грызунов или CDR-последовательностей соответствующими последовательностями человеческого антитела. В соответствии с этим, такие «гуманизированные» антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых в основном меньшая часть, по сравнению с переменным доменом интактного человеческого антитела, заменена соответствующей последовательностью от нечеловеческого антитела. Фактически, гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки CDR, а возможно, и некоторые остатки FR заменены остатками, происходящими от аналогичных участков антител грызунов.

При создании гуманизированных антител в целях снижения антигенности и НАМА-ответа (вырабатывания человеческих антимышечных антител) при использовании данного антитела для терапевтического лечения человека, очень важно выбрать переменные домены как легкой, так и тяжелой цепи человеческого антитела. Снижение

5 уровня НАМА-ответа или предотвращение такого ответа является важным аспектом клинической разработки подходящих терапевтических средств. См., например, 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

10 (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Как описано в этой заявке, настоящее изобретение относится к антителам, которые были гуманизированы в целях снижения или предотвращения НАМА-ответа. Варианты этих антител могут быть также получены рутинными методами, известными специалистам, некоторые из которых подробно описаны ниже. В соответствии с так называемым методом "подгонки",

15 последовательность переменного домена антитела грызуна скринируют по всей библиотеке известных последовательностей переменных доменов человеческого антитела. Затем идентифицируют последовательность V-домена человеческого антитела, которая является наиболее схожей с последовательностью грызунов, и берут в качестве человеческой каркасной области (FR) для создания гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)). В другом

20 методе используют конкретную каркасную область, происходящую от консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Эта же самая каркасная область может быть использована для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci.,

25 USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Так, например, аминокислотная последовательность антитела, описанного в настоящей заявке, может служить в качестве исходной (родительской) последовательности для диверсификации последовательности(ей) каркасной области и/или гиперпеременной области. Выбранная каркасная последовательность, к которой

30 присоединена исходная гиперпеременная последовательность, называется здесь акцепторной человеческой каркасной последовательностью. Акцепторные человеческие каркасные последовательности могут быть получены или могут происходить от человеческого иммуноглобулина (областей VL и/или VH), а предпочтительно акцепторные человеческие каркасные последовательности могут быть получены или

35 могут происходить от человеческой консенсусной каркасной последовательности, поскольку такие каркасные последовательности, как было продемонстрировано, обладают минимальной иммуногенностью, либо вообще не обладают иммуногенностью у человека.

Если акцептор происходит от человеческого иммуноглобулина, то человеческая каркасная последовательность может быть, но необязательно, выбрана на основе ее гомологии с донорной каркасной последовательностью путем выравнивания донорной каркасной последовательности с различными человеческими каркасными последовательностями, имеющимися в коллекции человеческих каркасных последовательностей, и отбора наиболее гомологичной каркасной последовательности

45 в качестве акцептора.

В одном из вариантов изобретения человеческие консенсусные каркасные области происходят от консенсусных каркасных последовательностей VH подгруппы III и/или VL каппа подгруппы I.

Таким образом, акцепторная человеческая каркасная область VH может содержать одну, две, три или все нижеследующие каркасные последовательности:

FR1, содержащую EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),

FR2, содержащую WVRQAPGKGGLEWV (SEQ ID NO: 144),

FR3, содержащую RFTISX₁DX₂SKNTX₃YLMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 147),
где X₁ представляет собой A или R, X₂ представляет собой T или N, и X₃ представляет собой A или L,

FR4, содержащую WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

Примерами консенсусных каркасных областей VH, являются:

консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы I минус CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 108);

консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы I минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 109-111);

консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы II минус CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 112);

консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы II минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 113-115);

консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы III минус CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 116);

консенсусная каркасная область человеческой VH подгруппы III минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 117-119);

акцепторная каркасная область человеческой VH минус CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 120);

акцепторная каркасная область человеческой VH минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 121-122);

акцепторная каркасная область 2 человеческой VH минус CDR по Кэбату (SEQ ID NO: 123); или

акцепторная каркасная область 2 человеческой VH минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 124-126).

В одном из вариантов изобретения акцепторная каркасная область человеческой VH содержит одну, две, три или все нижеследующие каркасные последовательности:

FR1, содержащую EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),

FR2, содержащую WVRQAPGKGGLEWV (SEQ ID NO: 144),

FR3, содержащую RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 148),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 149),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO: 150) или

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO: 151),

FR4, содержащую WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

Акцепторная каркасная область человеческой VL может содержать одну, две, три или все нижеследующие каркасные последовательности:

FR1, содержащую DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 139),

FR2, содержащую WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140),

FR3, содержащую GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141),

FR4, содержащую FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

Примерами консенсусных каркасных последовательностей VL являются:

консенсусная каркасная последовательность человеческой VL каппа подгруппы I (SEQ ID NO: 127);

консенсусная каркасная последовательность человеческой VL каппа подгруппы II (SEQ ID NO: 128);

консенсусная каркасная последовательность человеческой VL каппа подгруппы III (SEQ ID NO: 129); или

5 консенсусная каркасная последовательность человеческой VL каппа подгруппы IV (SEQ ID NO: 130).

Хотя последовательность акцептора может быть идентична выбранной человеческой каркасной последовательности, независимо от того, происходит ли она от человеческого иммуноглобулина или от человеческой консенсусной каркасной последовательности, 10 однако в настоящем изобретении рассматривается акцепторная последовательность, которая, по сравнению с человеческой последовательностью иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной последовательностью, может содержать уже имеющиеся аминокислотные замены. Эти уже имеющиеся замены, по сравнению с человеческой последовательностью иммуноглобулина или консенсусной каркасной 15 последовательностью, предпочтительно являются минимальными, а обычно отличаются только на четыре, три, два аминокислотных остатка или один аминокислотный остаток.

Остатки гипервариабельных областей нечеловеческого антитела вводят в акцепторные каркасные области человеческих VL и/или VH. Так, например, могут быть включены остатки, соответствующие остаткам CDR по Кэбату, остаткам 20 гипервариабельной петли по Чотия, остаткам Abm и/или контактирующим остаткам. При этом могут быть включены, но необязательно, остатки удлиненной гипервариабельной области: 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3), 26-35B (H1), 50-65, 47-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3).

Хотя «введение» остатков гипервариабельной области обсуждается в описании 25 настоящего изобретения, однако следует отметить, что такое введение может быть осуществлено различными методами, например, нуклеиновая кислота, кодирующая нужную аминокислотную последовательность, может быть получена путем внесения мутаций в нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность мышинного вариабельного домена, с последующей заменой каркасных остатков на остатки 30 акцепторной человеческой каркасной области, или путем внесения мутаций в нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность человеческого вариабельного домена, с последующей заменой остатков гипервариабельного домена на остатки нечеловеческого антитела, или путем синтеза нуклеиновой кислоты, кодирующей нужную последовательность и т.п.

35 В описанных здесь примерах варианты с присоединенной гипервариабельной областью были получены методом мутагенеза Kunkel нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческие акцепторные последовательности, с использованием отдельного олигонуклеотида для каждой гипервариабельной области (Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)). Соответствующие замены могут быть введены в каркасную и/или 40 гипервариабельную область рутинными методами для коррекции и восстановления нужных взаимодействий «гипервариабельная область-антиген».

Фаговое (фагмидное) представление (также называемое здесь, в некоторых случаях, фаговым представлением) может быть применено как удобный и быстрый метод продуцирования и скрининга многих различных потенциальных вариантов антител в 45 библиотеке, полученной путем рандомизации последовательностей. Однако специалистам известны и другие методы получения и скрининга модифицированных антител.

Технология фагового (фагмидного) представления является эффективным средством

для продуцирования и отбора новых белков, связывающихся с лигандом, таким как антиген. Применение технологии фагового (фагмидного) представления позволяет получать крупные библиотеки вариантов белков, которые могут быть быстро отсортированы на последовательности, которые связываются с молекулой-мишенью с высокой аффинностью. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептидные варианты, обычно присоединяют к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок вирусной оболочки, такой как белок, кодируемый геном III, или белок, кодируемый геном VIII. Были разработаны одновалентные системы фагмидного представления, в которых последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок или полипептид, присоединена к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей часть белка, кодируемого геном III (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). В одновалентной системе фагмидного представления гибридный ген экспрессируется на низком уровне, и при этом белки гена III дикого типа экспрессируются так, что инфекционность частиц сохраняется. Методы получения пептидных библиотек и скрининга этих библиотек описаны во многих патентах (например, в патенте США No 5723286, в патенте США No 5432018, в патенте США No 5580717, в патенте США No 5427908 и в патенте США No 5498530).

Библиотеки антител или антигенсвязывающих полипептидов были получены различными методами, включая модификацию одного гена путем встраивания рандомизированных последовательностей ДНК или клонирования семейства родственных генов. Методы представления антител или антигенсвязывающих фрагментов с применением технологии фагового представления описаны в патентах США No 5750373, 5733743, 5837242, 5969108, 6172197, 5580717 и 5658727. Затем библиотеку скринируют на присутствие антител или антигенсвязывающих белков, обладающих нужными свойствами.

Методы замены выбранной аминокислоты на уровне матричной нуклеиновой кислоты хорошо известны специалистам, и некоторые из них описаны в настоящей заявке. Так, например, остатки гипервариабельной области могут быть заменены методом Кункеля. См., например, Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

Последовательность олигонуклеотидов включает один или несколько сконструированных наборов кодонов для модифицируемых остатков гипервариабельной области. Набором кодонов является набор из различных нуклеотидных триплетов, используемых для кодирования нужных аминокислотных вариантов. Наборы кодонов могут быть представлены символами, обозначающими конкретные нуклеотиды или эквимоллярные смеси нуклеотидов, представленных ниже в соответствии с кодом IUB.

Коды IUB

G Гуанин

A Аденин

T Тимин

C Цитозин

R (A или G)

Y (C или T)

M (A или C)

K (G или T)

S (C или G)

W (A или T)

H (A или C или T)

B (C или G или T)

V (A или C или G)

D (A или G или T) H

N (A или C или G или T).

Так, например, в серии кодонов DVK, D может представлять собой нуклеотиды A или G или T; V может представлять собой A или G или C, а K может представлять собой G или T. Такой набор кодонов может составлять 18 различных кодонов и может кодировать аминокислоты Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys.

Наборы олигонуклеотидов или праймеров могут быть синтезированы стандартными методами. Набор олигонуклеотидов может быть синтезирован, например, методом твердофазного синтеза и может содержать последовательности, которые представляют собой все возможные комбинации нуклеотидных триплетов, имеющих в таком наборе кодонов, и которые кодируют желаемую группу аминокислот. Синтез олигонуклеотидов с «вырожденностью» отобранных нуклеотидов в некоторых положениях хорошо известен специалистам. Такие наборы нуклеотидов, имеющие определенные наборы кодонов, могут быть синтезированы на коммерчески доступных синтезаторах нуклеиновых кислот (поставляемых, например, Applied Biosystems, Foster City, CA), либо они могут быть закуплены у поставщиков (например, у Life Technologies, Rockville, MD). Поэтому набор синтезированных олигонуклеотидов, имеющих конкретный набор кодонов, обычно включает множество олигонуклеотидов с различными последовательностями, отличающимися набором кодонов в полноразмерной последовательности. Олигонуклеотиды, используемые в соответствии с настоящим изобретением, имеют последовательности, позволяющие гибридизироваться с матрицей нуклеиновой кислоты переменных доменов, а также могут включать рестрикционные сайты для клонирования.

В одном из этих методов последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислот, могут быть созданы методом олигонуклеотид-опосредуемого мутагенеза. Такой метод хорошо известен специалистам и описан Zoller et al. *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504 (1987). Вкратце, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислот, получают путем гибридизации набора олигонуклеотидов, содержащих нужные наборы кодонов, с матричной ДНК, где указанной матрицей является одноцепочечная форма плазмиды, содержащая последовательность матричной нуклеиновой кислоты переменной области. После гибридизации, для синтеза полноразмерной второй комплементарной цепи матрицы используют ДНК-полимеразу, что позволяет встраивать олигонуклеотидный праймер, и такая цепь будет содержать наборы кодонов, обеспечиваемые набором олигонуклеотидов.

Обычно используют олигонуклеотиды длиной по меньшей мере 25 нуклеотидов. Оптимальный олигонуклеотид имеет 12-15 нуклеотидов, которые являются полностью комплементарными матрице с любой стороны нуклеотида(ов), кодирующего(их) мутацию(и). Это будет гарантировать правильную гибридизацию олигонуклеотида с одноцепочечной молекулой матричной ДНК. Олигонуклеотиды могут быть легко синтезированы методами, известными специалистам, и описанными в публикации Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

ДНК-матрицу получают с использованием векторов, происходящих от векторов бактериофага M13 (подходящими являются коммерчески доступные векторы M13mp18 и M13mp19), или с использованием векторов, которые содержат одноцепочечный ориджин репликации фага, описанный Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Таким образом, ДНК, которая является мутированной, может быть встроена в один из этих

векторов с получением одноцепочечной матрицы. Получение одноцепочечной матрицы описано в разделах 4.21-4.41 руководства Sambrook et al., см. выше.

Для модификации нативной последовательности ДНК олигонуклеотид гибридизируют с одноцепочечной матрицей в подходящих условиях гибридизации. Затем, для синтеза комплементарной цепи матрицы, проводимого с использованием олигонуклеотида в качестве праймера, добавляют ДНК-полимеризующий фермент, обычно ДНК-полимеразу Т7 или фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I. В результате образуется гетеродуплексная молекула, в которой одна цепь ДНК кодирует мутированную форму гена 1, а другая цепь (исходная матрица) кодирует нативную немодифицированную последовательность гена 1. Затем такую гетеродуплексную молекулу переносят в подходящую клетку-хозяина, обычно в прокариот, такой как *E. coli* JM101. После культивирования клеток, их высевает на планшеты с агарозой и скринируют с использованием олигонуклеотидного праймера, радиоактивно помеченного 32-фосфатом в целях идентификации бактериальных колоний, содержащих мутированную ДНК.

Только что описанный метод может быть модифицирован в целях создания гомодуплексной молекулы, в которой обе цепи плазмиды содержат мутацию(и). Такую модификацию проводят следующим образом: одноцепочечный олигонуклеотид гибридизируют с одноцепочечной матрицей, как описано выше. Смесь из трех дезоксирибонуклеотидов, а именно дезоксирибоаденозина (dATP), дезоксирибогуанозина (dGTP) и дезоксириботимидина (dTТ), объединяют с модифицированным тиодезоксирибоцитозином, обозначаемым dCTP-(aS) (который может быть получен от Amersham). Эту смесь добавляют к комплексу «матрица-олигонуклеотид». После добавления ДНК-полимеразы к этой смеси образуется цепь ДНК, идентичная матрице, за исключением мутированных оснований. Кроме того, эта новая цепь ДНК будет содержать dCTP-(aS) вместо dCTP, что будет обеспечивать защиту ДНК от расщепления рестриктирующей эндонуклеазой. После образования одноцепочечного разрыва в цепи-матрице двухцепочечного гетеродуплекса под действием соответствующего рестриктирующего фермента, цепь-матрица может быть гидролизована нуклеазой *Eco*III или другой соответствующий нуклеазой в положении, находящемся за областью мутагенного(ых) сайта(ов). Затем реакцию прекращают, в результате чего образуется молекула, которая является одноцепочечной только наполовину. Затем получают полноразмерный двухцепочечный ДНК-гомодуплекс с использованием ДНК-полимеразы в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеотид-трифосфатов, АТР и ДНК-лигазы. Затем такая гомодуплексная молекула может быть перенесена в подходящую клетку-хозяина.

Как было показано выше, последовательность набора олигонуклеотидов имеет длину, достаточную для гибридизации с матричной нуклеиновой кислотой, и может также, но необязательно, содержать рестрикционные сайты. ДНК-матрица может быть получена с помощью векторов, которые происходят от векторов бактериофага M13 или векторов, содержащих одноцепочечный ориджин репликации фага, как описано в публикации Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Таким образом, ДНК, которая является мутированной, должна быть встроена в один из этих векторов с получением одноцепочечной матрицы. Получение одноцепочечной матрицы описано в разделах 4.21-4.41 руководства Sambrook et al., см. выше.

В соответствии с другим методом связывание с антигеном может быть восстановлено в процессе гуманизации антител путем отбора повторно спаренных гипервариабельных областей (см. заявку № 11/061841, поданную 18 февраля 2005 г.). Такой метод включает

введение нечеловеческих гипервариабельных областей в акцепторную каркасную последовательность, а затем введение одной или нескольких аминокислотных замен в одну или несколько гипервариабельных областей без модификации акцепторной каркасной последовательности. Альтернативно введение одной или нескольких аминокислотных замен может сопровождаться модификацией в акцепторной каркасной последовательности.

В соответствии с другим методом библиотека может быть получена путем конструирования наборов вышерасположенных и нижерасположенных олигонуклеотидов, где каждый из этих наборов имеет множество олигонуклеотидов с различными последовательностями, образуемыми сериями кодонов, присутствующих в последовательности олигонуклеотидов. Наборы вышерасположенных и нижерасположенных олигонуклеотидов, вместе с последовательностью матричной нуклеиновой кислоты вариабельного домена, могут быть использованы в полимеразной цепной реакции с образованием «библиотеки» ПЦР-продуктов. ПЦР-продукты могут называться «кластерами нуклеиновых кислот», поскольку они могут быть присоединены к другим родственным или неродственным последовательностям нуклеиновой кислоты, например, к белкам вирусной оболочки и к доменам димеризации, с применением хорошо разработанных методов молекулярной биологии.

Последовательность ПЦР-праймеров включает один или несколько сконструированных наборов кодонов в положениях, доступных для растворителя, и в различных положениях широкого ряда в гипервариабельной области. Как было описано выше, набором кодонов является набор из различных последовательностей нуклеотидных триплетов, используемых для кодирования нужных вариантов аминокислот.

Подходящие антитела, удовлетворяющие нужным критериям, и отобранные путем проведения соответствующих стадий скрининга/отбора, могут быть выделены и клонированы стандартными рекомбинантными методами.

Также важно, чтобы гуманизированные антитела сохраняли высокую аффинность связывания с антигеном и другие желаемые биологические свойства. Для достижения этой цели, в соответствии с предпочтительным методом, гуманизированные антитела получают путем анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с применением трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известны специалистам. Также существуют компьютерные программы для иллюстрации и представления вероятных трехмерных комбинаторных структур выбранных последовательностей-кандидатов иммуноглобулина. Изучение такого представления позволяет проанализировать вероятную роль, которую играют данные остатки в функционировании последовательности-кандидата иммуноглобулина, то есть провести анализ влияния этих остатков на способность иммуноглобулина-кандидата связываться с антигеном. В этом методе остатки FR могут быть выбраны из последовательностей реципиента и «импортных» последовательностей и объединены, так, чтобы можно было получить антитело с нужными свойствами, такими как повышенная аффинность к антигену(ам)-мишени(ям). В основном, непосредственное и наибольшее влияние на связывание с антигеном оказывают остатки гипервариабельной области.

Рассматриваются также различные формы гуманизированного анти-CD79b антитела. Так, например, гуманизированным антителом может быть фрагмент антитела, такой как Fab, который конъюгируют, но необязательно, с одним или несколькими

цитотоксическими средствами, с образованием иммуноконъюгата. Альтернативно гуманизированным антителом может быть интактное антитело, такое как интактное антитело IgG1.

В качестве альтернативы гуманизации могут быть получены человеческие антитела.

5 Так, например, в настоящее время могут быть получены трансгенные животные (например, мыши), которые после иммунизации будут обладать способностью продуцировать полный репертуар человеческих антител при отсутствии эндогенно продуцируемого иммуноглобулина. Так, например, указывалось, что гомозиготная делеция гена в области стыка тяжелой цепи антитела (J_H) у химерных мышей и у мышей
10 с мутированной зародышевой линией приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенного антитела. Перенос массивов генов иммуноглобулина человеческой зародышевой линии таким мышам с мутированной зародышевой линией приводит к продуцированию человеческих антител после введения антигена. См., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*,
15 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.* 7:33 (1993); патенты США NN 5545806, 5569825, 5591669 (все от GenPharm); 5545807; и WO 97/17852.

Альтернативно технология фагового представления (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]) может быть использована для продуцирования человеческих антител и
20 фрагментов антител *in vitro* из наборов генов варибельного домена иммуноглобулина (V) от неиммунизированных доноров. В соответствии с этим методом, гены домена V антител клонируют с сохранением рамки считывания в мажорный или минорный ген белковой оболочки нитчатого фага, такого как M13 или fd, и представляют на поверхности фаговой частицы как функциональные фрагменты антител. Поскольку
25 нитчатая частица содержит копию одноцепочечной ДНК генома фага, то отбор, проводимый на основе функциональных свойств антитела, также позволяет отбирать ген, кодирующий антитело, обладающее этими свойствами. Таким образом, фag имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговое представление может быть осуществлено в различных форматах, описанных в публикациях Johnson, Kevin S. and
30 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Для фагового представления может быть использовано несколько источников V-генных сегментов. В публикации Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) описано выделение разнообразных массивов антител против оксазолонa из небольшой рандомизированной комбинаторной библиотеки V-генов, полученной из селезенки иммунизированных мышей. Может быть
35 также сконструирован набор V-генов от неиммунизированных людей-доноров, и могут быть получены антитела против разнообразного массива антигенов (включая аутоантигены), в основном методами, описанными в публикации Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), или Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). См., также патенты США №№ 5565332 и 5573905.

Как обсуждалось выше, человеческие антитела могут быть также получены с
40 использованием *in vitro* активированных В-клеток (см., также патенты США NO. 5567610 и 5229275).

4. Фрагменты антител

В некоторых случаях желательно использовать неполноразмерные антитела, а их
45 фрагменты. Меньший размер фрагментов позволяет обеспечивать быстрый клиренс, что может улучшать доступ к солидным опухолям.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные методы. Традиционно, эти фрагменты образуются в результате протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical*

Methods 24:107-117 (1992) и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако эти фрагменты могут продуцироваться непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут экспрессироваться в E. coli и секретироваться из E. coli, что облегчает продуцирование этих фрагментов в большом количестве.

фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Альтернативно Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно выделены из E. coli и химически связаны с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, F(ab')₂-фрагменты могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантной клетки-хозяина. Fab- и F(ab')₂-фрагмент с более длительным временем полужизни in vivo, содержащий остатки, связывающиеся с эпитопом рецептора «спасения», описаны в патенте США № 5869046. Специалистам известны и другие методы получения фрагментов антител. В других вариантах изобретения выбранным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185, патент США № 5571894 и патент США № 5587458. Fv- и sFv-фрагменты присутствуют только у видов с интактными комбинированными сайтами, не содержащими константных областей, а поэтому они являются подходящими для снижения уровня неспецифического связывания в процессе их применения in vivo. Могут быть сконструированы гибридные sFv-белки с получением гибридного эффекторного белка у аминокислотного или карбокси-конца sFv. См. Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, см. выше. Фрагментом антитела может быть также «одноцепочечное антитело», например, антитело, описанное в патенте США № 5641870. Такие одноцепочечные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

5. Биспецифические антитела

Биспецифическими антителами являются антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными эпитопами. Репрезентативные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами белка CD79b, описанного в настоящей заявке. Другие такие антитела могут представлять собой комбинацию CD79b-связывающего сайта с сайтом связывания для других белков. Альтернативно, ветвь антитела против CD79b может быть объединена с ветвью, которая связывается с триггерной молекулой на лейкоцитах, такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD3) или Fc-рецепторы для IgG (FcγR), такие как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), так, чтобы клеточные защитные механизмы были сфокусированы в CD79b-экспрессирующих клетках и локализованных в этих клетках. Биспецифические антитела могут быть также использованы для определения локализации цитотоксических агентов в клетках, экспрессирующих CD79b. Эти антитела имеют CD79b-связывающую ветвь и ветвь, которая связывается с цитотоксическим агентом (таким как, например, сапорин, антитело против интерферона-α, винкалкалоид, цепь рицина А, метотрексат или гаптен, меченный радиоактивным изотопом). Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические F(ab')₂-антитела).

В WO 96/16673 описано биспецифическое анти-ErbB2/анти-FcγRIII антитело, а в патенте США № 5837234 описано биспецифическое анти-ErbB2/анти-FcγRI антитело. Биспецифическое анти-ErbB2/Fcα антитело описано в WO98/02463. В патенте США № 5821337 описано биспецифическое анти-ErbB2/анти-CD3 антитело.

Методы получения биспецифических антител известны специалистам. Традиционное продуцирование полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, где эти две цепи обладают

различной специфичностью (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Эти гибридомы (квадромы), из-за рандомизированного набора тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна молекула имеет “правильную” биспецифическую структуру.

5 Очистка такой “правильной” молекулы, которую обычно осуществляют путем постадийного проведения аффинной хроматографии, представляет собой определенные трудности и дает низкий выход продукта. Аналогичные процедуры описаны в WO 93/08829 и в публикации Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом, переменные домены антитела с нужными
10 специфичностями связывания (объединенные сайты “антитело-антиген”) присоединяют к последовательностям константного домена иммуноглобулина. Такое присоединение предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, C_H2 и C_H3. При этом предпочтительно, чтобы этот гибрид имел первую константную область тяжелой цепи (C_H1), содержащую
15 сайт, необходимый для связывания с легкой цепью, присутствующей по меньшей мере в одном из гибридов. ДНК, кодирующие гибриды тяжелой цепи иммуноглобулина и, если это необходимо, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессионные векторы, и котрансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает высокую степень гибкости при коррекции соотношений трех
20 полипептидных фрагментов в тех вариантах изобретения, в которых неравные содержания трех полипептидных цепей, используемых в данной конструкции, дают оптимальные выходы нужного биспецифического антитела. Однако можно встраивать кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один
25 экспрессионный вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей при равном соотношении дает высокие выходы, или если такие соотношения не оказывают значительного влияния на выход нужной комбинации цепи.

В предпочтительном варианте такого подхода, биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющей первую специфичность
30 связывания, в одной ветви, и гибридной пары “тяжелая цепь-легкая цепь” иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания), в другой ветви. Было обнаружено, что такая асимметричная структура облегчает отделение нужного биспецифического соединения от нежелательных комбинаций иммуноглобулиновой цепи, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина
35 только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает простой способ его выделения. Этот способ описан в WO 94/04690. Более подробное описание получения биспецифических антител см., например, у Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

В соответствии со вторым подходом, описанным в патенте США № 5731168, граница
40 между парой молекул антитела может быть сконструирована для максимизации процента гетеродимеров, выделенных из рекомбинантной клеточной культуры. Такая граница предпочтительно содержит по меньшей мере часть домена C_H3. В этом методе небольшие боковые цепи одной или нескольких аминокислот в пограничной области первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например,
45 тирозина или триптофана). В пограничной области второй молекулы антитела создают компенсирующие «полости», имеющие размер, идентичный или аналогичный размеру более крупной(ых) боковой(ых) цепи(ей), путем замены крупных боковых цепей аминокислот более мелкими боковыми цепями (например, аланина или треонина). Это

позволяет увеличить выход гетеродимеров по отношению к другим нежелательным конечным продуктам, таким как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают перекрестно-сшитые антитела или их “гетероконъюгаты”. Так, например, одно из антител в указанном гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Такие антитела были, например, предложены для доставки клеток иммунной системы к нежелательным клеткам (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекций (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Антитела-гетероконъюгаты могут быть получены любыми стандартными методами перекрестного сшивания. Подходящие перекрестно-сшивающие агенты хорошо известны специалистам и описаны в патенте США № 4676980 наряду с различными методами перекрестного сшивания.

Методы продуцирования биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Так, например, биспецифические антитела могут быть получены путем химического связывания. В работе Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) описана процедура, в которой интактные антитела подвергают протеолитическому расщеплению с образованием F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии агента, образующего дитиоловый комплекс, такого как арсенит натрия, для стабилизации смежных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). После этого, одно из производных Fab'-TNB снова превращают в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламином и смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab'-TNB, в результате чего получают биспецифическое антитело. Такие продуцированные биспецифические антитела могут быть использованы в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Последние достижения в данной области позволяют проводить прямое выделение из *E. coli* фрагментов Fab'-SH, которые могут быть химически связаны с образованием биспецифических антител. В работе Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) описано продуцирование полностью гуманизированной молекулы F(ab')₂ биспецифического антитела. Каждый Fab'-фрагмент был отдельно секретирован из *E. coli* и подвергнут прямому химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Таким образом, полученное биспецифическое антитело обладает способностью связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2, и с нормальными человеческими Т-клетками, а также запускает литическую активность человеческих цитотоксических лимфоцитов против опухоли-мишени человеческой молочной железы.

Были также описаны различные методы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Так, например, биспецифические антитела были продуцированы с использованием “лейциновых молний”. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии, происходящие от белков Fos и Jun, были присоединены к Fab'-частям двух других антител путем лигирования генов. Гомодимеры антитела были восстановлены в шарнирной области с образованием мономеров, а затем снова окислены с образованием гетеродимеров антител. Этот метод может быть также использован для продуцирования гомодимеров антитела. Технология “диантител”, описанная Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6444-6448 (1993), обеспечивает альтернативный механизм получения фрагментов биспецифического антитела. Эти фрагменты содержат V_H, присоединенный к V_L посредством линкера, который является слишком коротким для создания пары между двумя доменами одной и той же цепи. В

соответствии с этим V_L - и V_H -домены одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными V_L - и V_H -доменами другого фрагмента, образуя тем самым два антигенсвязывающих сайта. Также была описана другая стратегия получения фрагментов биспецифического антитела с использованием одноцепочечных Fv(sFv)-

димеров. См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Рассматриваются также антитела с более чем двумя валентностями. Так, например, могут быть получены и триспецифические антитела. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Гетероконъюгированные антитела

Гетероконъюгированные антитела также входят в объем настоящего изобретения. Гетероконъюгированные антитела состоят из двух ковалентно связанных антител.

Такие антитела, например, как предполагается, нацеливают клетки иммунной системы на нежелательные клетки [патент США № 4676980], и поэтому они могут быть использованы для лечения ВИЧ-инфекций [WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089].

Известно, что антитела могут быть получены *in vitro* методами синтеза белков, включая методы с использованием перекрестно-сшивающих агентов. Так, например, иммунотоксины могут быть сконструированы путем проведения реакции дисульфидного обмена или образования тиоэфирной связи. Примерами подходящих реагентов, используемых для этой цели, являются иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат, и такие реагенты описаны, например, в патенте США № 4676980.

7. Поливалентные антитела

Поливалентное антитело может быть быстрее интернализовано (и/или оно может быстрее подвергаться катаболизму), чем двухвалентное антитело благодаря экспрессии антигена в клетке, с которым связываются антитела. Антителами согласно изобретению могут быть поливалентные антитела (не принадлежащие к классу IgM) с тремя или более антигенсвязывающими сайтами (например, четырехвалентные антитела), которые могут быть легко продуцированы посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи данного антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антигенсвязывающих сайтов.

Предпочтительный домен димеризации содержит (или состоит из них) Fc-область или шарнирную область. В этом случае антитело может содержать Fc-область и три или более антигенсвязывающих сайта, расположенных со стороны amino-конца по отношению к Fc-области. Описанное здесь предпочтительное поливалентное антитело содержит (или состоит из них) от трех и примерно до восьми антигенсвязывающих сайтов, а предпочтительно четыре антигенсвязывающих сайта. Поливалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (а предпочтительно, две полипептидных цепи), где указанная(ые) полипептидная(ые) цепь(и) содержит(ат) два или более переменных доменов. Так, например, полипептидная(ые) цепь(и) может (могут) содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где VD1 представляет собой первый

переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или полипептид, а n равно 0 или 1. Так, например, полипептидная(ые) цепь(и) может (могут) содержать: цепь «VH-CH1-гибкий линкер-VH-CH1-Fc-область»; или цепь «VH-CH1-VH-CH1-Fc-область». Поливалентное антитело согласно изобретению также, предпочтительно, содержит по меньшей мере два (а предпочтительно, четыре) полипептида переменного домена легкой цепи. Описанное здесь поливалентное антитело может, например, содержать примерно от двух до восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Рассматриваемые здесь полипептиды переменного

домена легкой цепи содержат вариабельный домен легкой цепи, а также, но необязательно, домен CL.

8. Конструирование антител с эффекторными функциями

Может оказаться желательным, модифицировать антитело согласно изобретению для придания ему эффекторных функций, например, для повышения антиген-зависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC) и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) антитела. Это может быть достигнуто путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела. Альтернативно или дополнительно, цистеиновый(е) остаток(ки) может (могут) быть введен(ы) в Fc-область, что будет приводить к образованию межцепевых дисульфидных связей в этой области. Таким образом, полученное гомодимерное антитело может обладать повышенной способностью к интернализации и/или повышенной способностью к комплемент-опосредуемому цитолизу клеток, и повышенной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). См. Caron et al., *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) и Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела, обладающие повышенной противоопухолевой активностью, могут быть также получены с использованием гетеробифункциональных перекрестно-сшивающих агентов, описанных в публикации Wolff et al., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Альтернативно может быть сконструировано антитело, имеющее две Fc-области, в результате чего может быть усилен лизис комплемента и повышена ADCC. См. Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989). Для увеличения времени полужизни антитела в сыворотке, в указанное антитело (а в частности, в его фрагмент) может быть введен эпитоп, связывающийся с рецептором «спасения», например, как описано в патенте США № 5739277. Используемый здесь термин «эпитоп, связывающийся с рецептором «спасения» означает эпитоп Fc-области молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), который является ответственным за увеличение времени полужизни молекулы IgG в сыворотке in vivo.

9. Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгатам (которые являются синонимами терминов «конъюгаты антитело-лекарственное средство» или «ADC»), включающим антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтическое средство, рост-ингибирующий агент, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (то есть радиоактивный конъюгат).

В некоторых вариантах изобретения иммуноконъюгат содержит антитело и химиотерапевтическое средство или другой токсин. Химиотерапевтические средства, используемые для получения указанных иммуноконъюгатов, описаны выше. Ферментативно активными токсинами и их фрагментами, которые могут быть использованы для этих целей, являются А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (от *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Для продуцирования радиоактивно конъюгированных антител могут быть использованы различные радионуклиды.

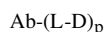
Примерами таких радионуклидов являются ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re. Конъюгаты антитела и цитотоксического лекарственного средства получают с использованием

различных бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Так, например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в публикации Vitetta et al. *Science*, 238:1098 (1987). ^{14}C -меченая 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) является репрезентативным хелатообразующим агентом для конъюгирования радионуклида с антителом. См. WO 94/11026.

В настоящем изобретении также рассматриваются конъюгаты антитела и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, ауристатиновые пептиды, такие как монометилауристин (ММАЕ)(синтетический аналог доластатина) майтанзиноиды, такие как DM1, трихотен и CC1065, и производные этих токсинов, обладающие токсической активностью.

Репрезентативные иммуноконъюгаты - конъюгаты «антитело-лекарственное средство»

Иммуноконъюгат (или «конъюгат антитело-лекарственное средство» (“ADC”)) согласно изобретению может представлять собой иммуноконъюгат формулы I, указанной ниже, где антитело конъюгировано (то есть ковалентно связано) с одной или несколькими молекулами лекарственного средства (D) посредством, но необязательно, линкера (L). ADC могут включать конъюгаты «тио-Mab-лекарственное средство» («TDC»).



I

В соответствии с этим, антитело может быть конъюгировано с лекарственным средством либо непосредственно, либо посредством линкера. В формуле I p означает среднее число молекул лекарственного средства на антитело, где указанное число может составлять, например, примерно от 1 до 20 молекул лекарственного средства на антитело, а в некоторых вариантах изобретения от 1 и до примерно 8 молекул лекарственного средства на антитело. Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей смесь соединений «антитело-лекарственное средство» формулы I, где средняя нагрузка лекарственного средства на антитело составляет примерно 2-5 или примерно 3-4.а.

Репрезентативные линкеры

Линкер может содержать один или более линкерных компонентов.

Репрезентативными линкерными компонентами являются 6-малеимидокапроил («MC»), малеимидопропаноил («MP»), валин-цитруллин («val-cit»), аланин-фенилаланин («alaph»), п-аминобензилоксикарбонил («PAB»), и компоненты, образующиеся в результате конъюгирования с линкерными реагентами: N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат («SPP»), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC», также обозначенный здесь «MCC») и N-сукцинимидил-(4-йодацетил)аминобензоат («SIAB»). Специалистам известны различные линкерные компоненты, некоторые из которых описаны ниже.

Линкером может быть «отщепляемый линкер», облегчающий высвобождение лекарственного средства в клетке. Так, например, могут быть использованы линкеры,

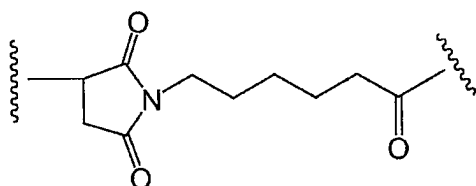
чувствительные к воздействию кислоты (например, гидразон); линкеры, чувствительные к действию протеазы (например, пептидазы); фотохимически неустойчивые линкеры; диметиловые линкеры или дисульфид-содержащие линкеры (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), патент США № 5208020).

В некоторых вариантах изобретения, линкер представлен нижеследующей формулой II:

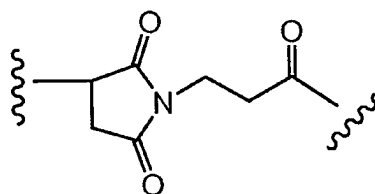


где A представляет собой удлиняющий компонент; а равно целому числу 0 или 1; W представляет собой аминокислоту; w независимо представляет собой целое число от 0 до 12; Y означает спейсерный компонент; y равно 0, 1 или 2, а Ab, D и p определены выше для формулы I. Репрезентативные варианты таких линкеров описаны в заявке США 2005-0238649 A1, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

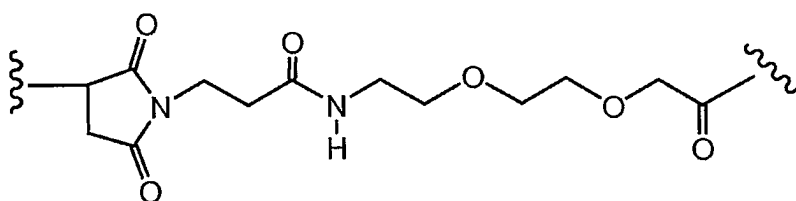
В некоторых вариантах изобретения линкерный компонент может содержать «удлиняющий компонент», который связывает антитело с другим линкерным компонентом или с молекулой лекарственного средства. Репрезентативные удлиняющие компоненты представлены ниже (где волнистая линия означает сайты ковалентного связывания с антителом):



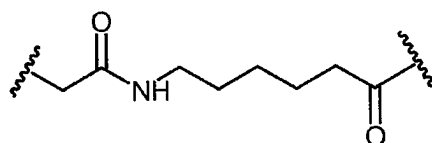
MC



MP



MPEG



В некоторых вариантах изобретения линкерный компонент может содержать аминокислотный компонент. В одном из таких вариантов изобретения аминокислотный компонент обеспечивает расщепление линкера протеазой, что облегчает высвобождение лекарственного средства из иммуноконъюгата после его обработки внутриклеточными протеазами, такими как лизосомные ферменты. См., например, Doronina et al. (2003)

Nat. Biotechnol. 21:778-784. Репрезентативными аминокислотными компонентами являются, но не ограничиваются ими, дипептид, трипептид, тетрапептид и пентапептид. Репрезентативными дипептидами являются валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe), фенилаланин-лизин (fk или phe-lys); или N-метил-валин-цитруллин (Me-val-cit). Репрезентативными трипептидами являются глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотный компонент может содержать природные аминокислотные остатки, а также небольшие аминокислоты и неприродные аминокислотные аналоги, такие как цитруллин. Аминокислотные компоненты могут быть сконструированы и оптимизированы по их селективности в отношении ферментативного расщепления конкретными ферментами, например, опухоль-ассоциированной протеазой, катепсином В, С и D, или плазминовой протеазой.

В некоторых вариантах изобретения линкерный компонент может содержать «спейсерный» компонент, который связывает антитело с молекулой лекарственного средства, либо непосредственно, либо посредством удлиняющего компонента и/или аминокислотного компонента. Спейсерным компонентом может быть «самоэлиминирующийся» или «несамоэлиминирующийся» компонент. «Несамоэлиминирующийся» спейсерный компонент представляет собой компонент, где часть спейсерного компонента или весь этот компонент остаются связанными с молекулой лекарственного средства после ферментативного (например, протеолитического) расщепления ADC. Примерами несамоэлиминирующихся спейсерных компонентов являются, но не ограничиваются ими, глициновый спейсерный компонент и глицин-глициновый спейсерный компонент. Также рассматриваются и другие комбинации пептидных спейсеров, чувствительных к последовательность-специфическому ферментативному расщеплению. Так, например, ферментативное расщепление ADC, содержащего глицин-глициновый спейсерный компонент, протеазой, ассоциированной с опухолевыми клетками, будет приводить к высвобождению молекулы «глицин-глицин-лекарственное средство» из остальной части ADC. В одном из таких вариантов молекула «глицин-глицин-лекарственное средство» подвергается одностадийному гидролизу в опухолевой клетке, что приводит к отщеплению глицин-глицинового спейсерного компонента от молекулы лекарственного средства.

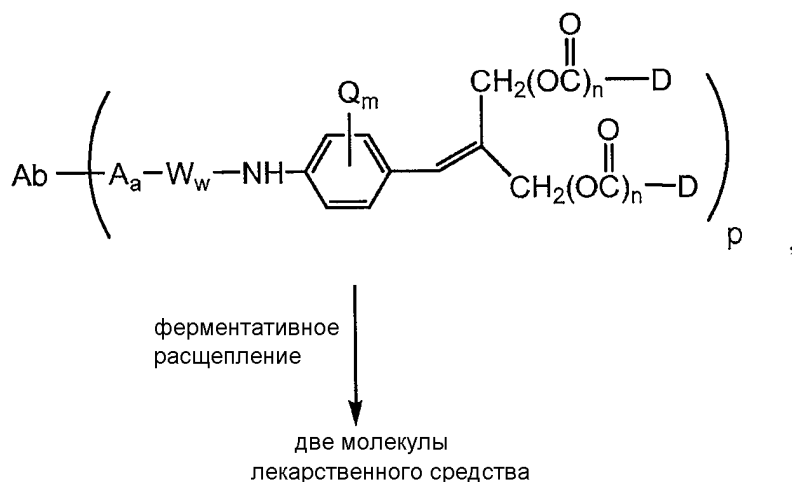
«Самоэлиминирующийся» спейсерный компонент обеспечивает высвобождение молекулы лекарственного средства без проведения одностадийного гидролиза. В некоторых вариантах изобретения, спейсерный компонент линкера содержит п-аминобензильную группу. В одном из таких вариантов п-аминобензиловый спирт присоединен к аминокислотному компоненту посредством амидной связи, а карбамат, метилкарбамат или карбонат образуются в результате реакции взаимодействия бензинового спирта с цитотоксическим агентом. См., например, Namann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103. В одном из вариантов изобретения спейсерным компонентом является п-аминобензилоксикарбонил (PAB). В некоторых вариантах изобретения фениленовая часть п-аминобензильной группы замещена Qm, где Q представляет собой C₁-C₈алкил, O-(C₁-C₈алкил), галоген, нитро или циано; m равно целому числу от 0 до 4. Другими примерами самоэлиминирующихся спейсерных компонентов являются, но не ограничиваются ими, ароматические соединения, которые по своим электронным свойствам аналогичны п-аминобензиловому спирту (см. например, заявку US 2005/0256030 A1), такому как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто- или пара-аминобензилацетали. Могут быть использованы спейсеры, которые подвергаются

циклизации после гидролиза амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2:223), соответствующим образом замещенные кольцевые бицикло[2.2.1]- и бицикло[2.2.2]-системы (Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-

аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55:5867).

Примерами самоэлиминирующихся спейсеров, используемых в ADC, являются амин-содержащие лекарственные средства, замещенные в α -положении глицина (Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27:1447).

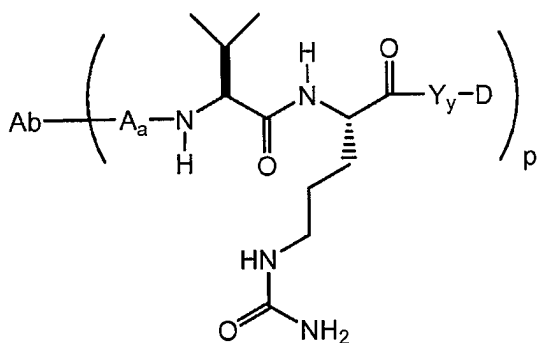
В одном из вариантов изобретения указанный спейсерный элемент представляет собой нижеуказанный разветвленный бис(гидроксиметил)стирол (BHMS), который может быть использован для включения и высвобождения множества лекарственных средств и который имеет структуру:



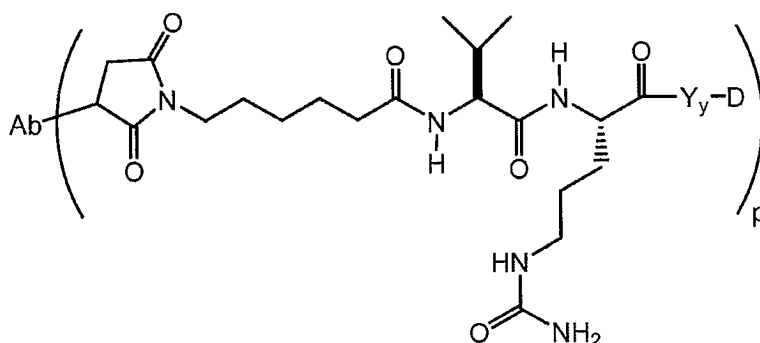
где Q представляет собой C_1 - C_8 алкил, O-(C_1 - C_8 алкил), галоген, нитро или циано; m равно целому числу от 0 до 4; n равно 0 или 1; а p равно числу от 1 и примерно до 20.

В другом варианте изобретения линкером L может быть линкер дендритного типа, используемый для ковалентного связывания более чем одной молекулы лекарственного средства с антителом посредством ветвящейся многофункциональной линкерной молекулы (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Дендритные линкеры могут повышать молярное отношение лекарственного средства к антителу, то есть нагрузку, которая соответствует эффективности ADC. Таким образом, если сконструированное на основе цистеина антитело содержит только одну реакционноспособную тиоловую группу цистеина, то посредством дендритного линкера может быть присоединено большое количество молекул лекарственного средства.

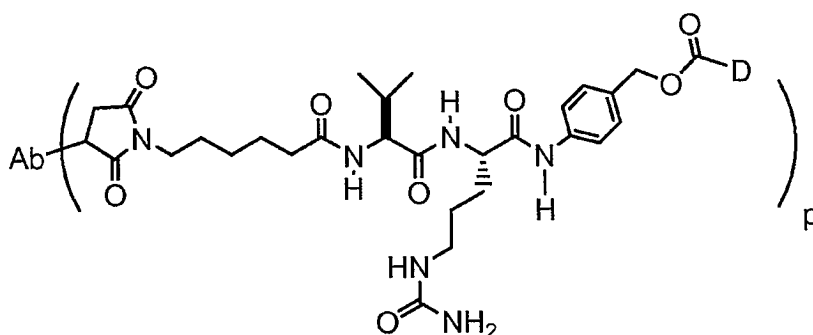
Репрезентативные линкерные компоненты и их комбинации представлены ниже для ADC формулы II:



Val-Cit или VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

Линкерные компоненты, включая удлиняющие, спейсерные и аминокислотные компоненты, могут быть синтезированы методами, известными специалистам, например, методами, описанными в заявке US 2005-0238649 A1.

b. Репрезентативные молекулы лекарственного средства

(1) Майтанзин и майтанзиноиды

В некоторых вариантах изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами майтанзиноида. Майтанзиноиды представляют собой митотические ингибиторы, которые действуют посредством ингибирования полимеризации тубулина. Майтанзин был впервые выделен у восточноафриканской землеройки *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Затем было обнаружено, что некоторые микробы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и сложные эфиры C-3-майтанзинола (патент США № 4151042). Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги описаны, например, в патентах США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533.

Молекулы майтанзиноидных лекарственных средств являются привлекательными молекулами лекарственных средств для использования в конъюгатах «антитело-

лекарственное средство», поскольку они (i) могут быть относительно легко получены путем ферментации или химической модификации или дериватизации продуктов ферментации, (ii) являются пригодными для дериватизации функциональными группами, подходящими для конъюгирования посредством присоединения дисульфидных и недисульфидных линкеров к антителам, (iii) являются стабильными в плазме и (iv) являются эффективными против различных опухолевых клеточных линий.

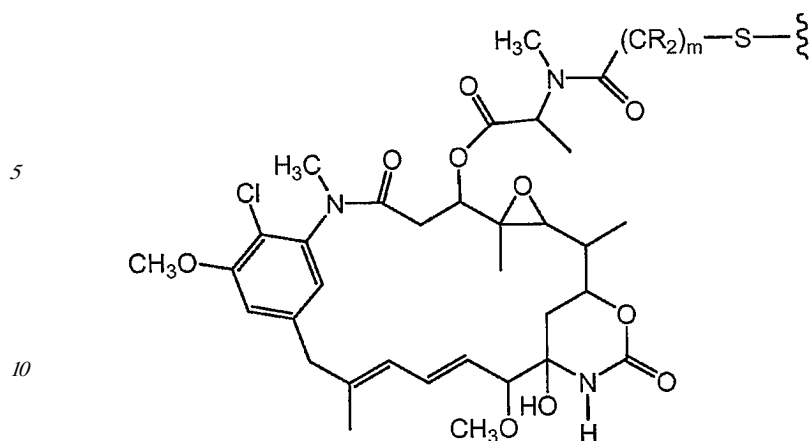
Майтанзиновые соединения, которые могут быть использованы в качестве майтанзиноидных лекарственных средств, хорошо известны специалистам и могут быть выделены из природных источников известными методами, либо они могут быть получены методами генной инженерии и ферментации (US 6790952; US 2005/0170475; Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973). Майтанзинол и его аналоги могут быть также получены известными методами синтеза.

Репрезентативными майтанзиноидными лекарственными средствами являются лекарственные средства, имеющие модифицированное ароматическое кольцо, такие как С-19-десхлоро (патент США 4256746)(полученные путем восстановления анзамитоцина Р2 алюмогидридом лития); С-20-гидроксид (или С-20-десметил) +/-С-19-десхлор (патенты США №№ 4361650 и 4307016) (полученные путем деметилирования с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces*, или путем дехлорирования с использованием ЛАН); и С-20-десметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-десхлоро (патент США № 4294757)(полученные путем ацилирования с использованием ацилхлоридов), и молекулы, имеющие модификации в других положениях.

Репрезентативными молекулами майтазиноидного лекарственного средства являются молекулы, имеющие модификации, такие как: С-9-SH (патент США 4424219)(полученные путем реакции взаимодействия майтанзинола с H₂S или P₂S₅); С-14-алкоксиметил (десметокси/CH₂OR)(патент США 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc)(патент США 4450254)(полученные от *Nocardia*); С-15-гидроксид/ацилокси (патент США 4364866)(полученные путем превращения майтанзинола под действием *Streptomyces*); С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (выделенные из *Trewia nudiflora*); С-18-N-десметил (патенты США №№ 4362663 и 4322348) (полученные путем деметилирования майтанзинола под действием *Streptomyces*); и 4,5-десокси (патент США 4371533)(полученные путем восстановления майтанзинола трихлоридом титана/ЛАН).

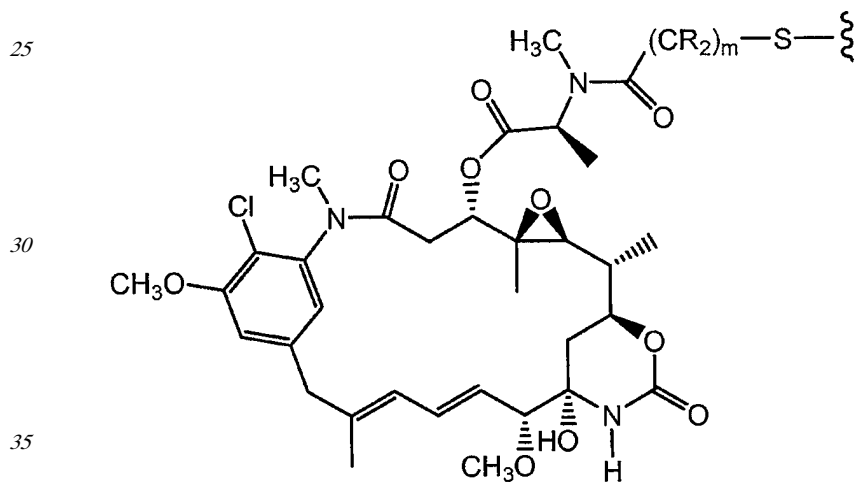
Известно, что многие положения в майтанзиновых соединениях, в зависимости от типа связи, могут быть использованы в качестве положения присоединения. Так, например, для образования сложноэфирной связи, подходящими являются С-3-положение, имеющее гидроксильную группу, С-14-положение, модифицированное гидроксиметилем, С-15-положение, модифицированное гидроксильной группой, и С-20-положение, имеющее гидроксильную группу (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

Молекулами майтанзиноидного лекарственного средства являются молекулы, имеющие структуру:



где волнистая линия означает ковалентное связывание атома серы молекулы
 майтанзиноидного лекарственного средства с линкером ADC. R может независимо
 15 представлять собой H или C₁-C₆алкил. Алкиленовой цепью, связывающей амидную
 группу с атомом серы, может быть метанил, этанил или пропил, то есть, где m равно
 1, 2 или 3 (US 633410; US 5208020; US 7276497; Chari et al. (1992) Cancer Res. 52:127-131;
 Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623).

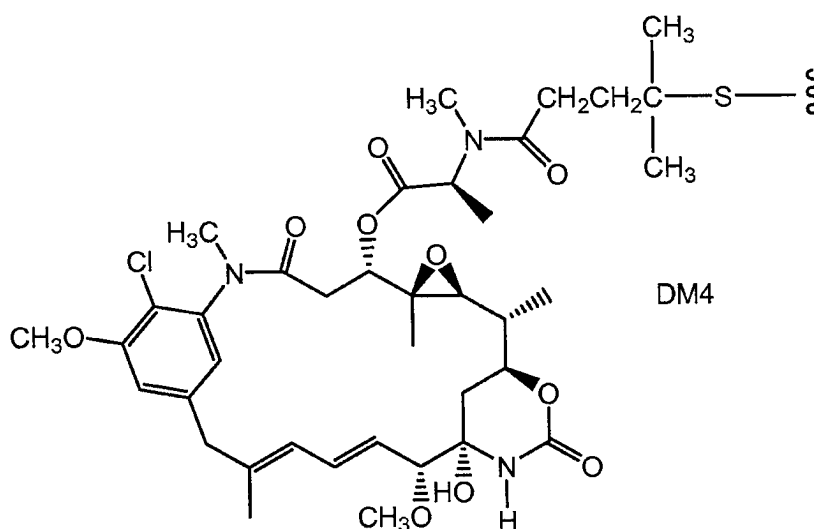
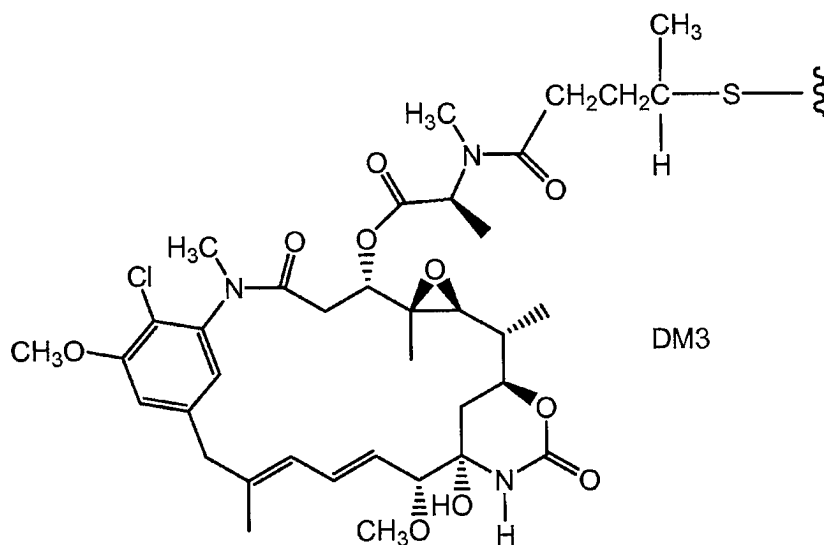
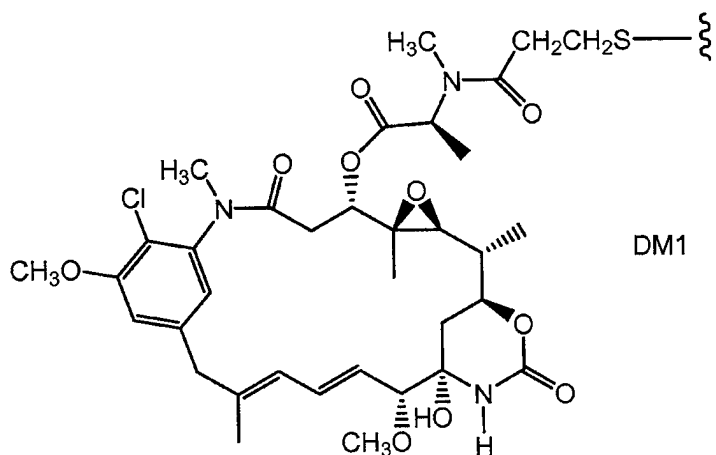
В настоящем описании рассматриваются все стереоизомеры молекул
 20 майтанзиноидного лекарственного средства соединений согласно изобретению, то есть
 любая комбинация R- и S-конфигураций у хиральных атомов углерода D. В одном из
 вариантов изобретения молекула майтанзиноидного лекарственного средства имеет
 нижеследующую стереохимическую структуру:



Репрезентативными вариантами молекул майтанзиноидного лекарственного средства
 являются: DM1, DM3 и DM4, имеющие структуры:

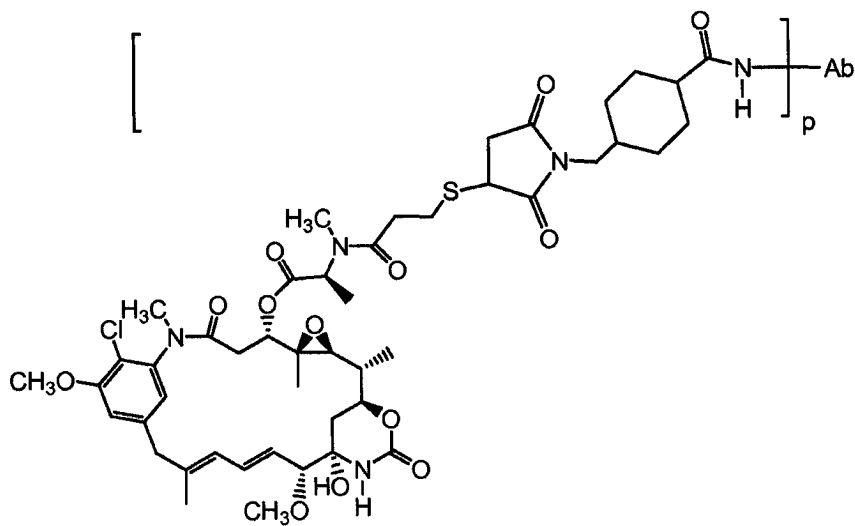
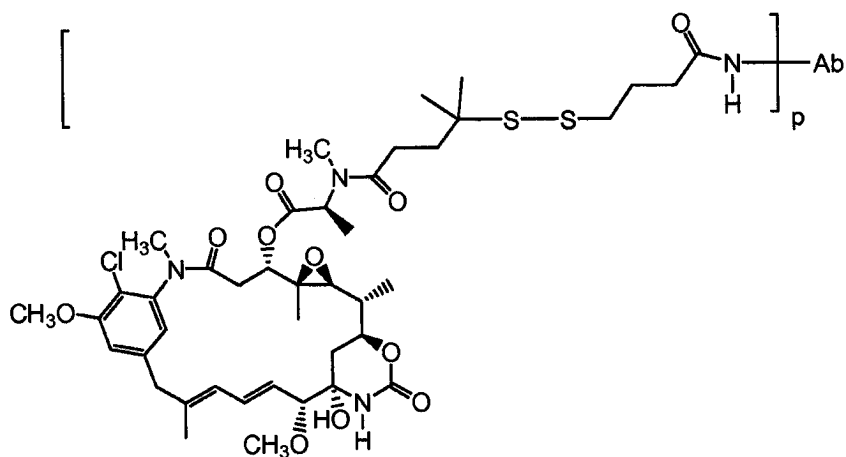
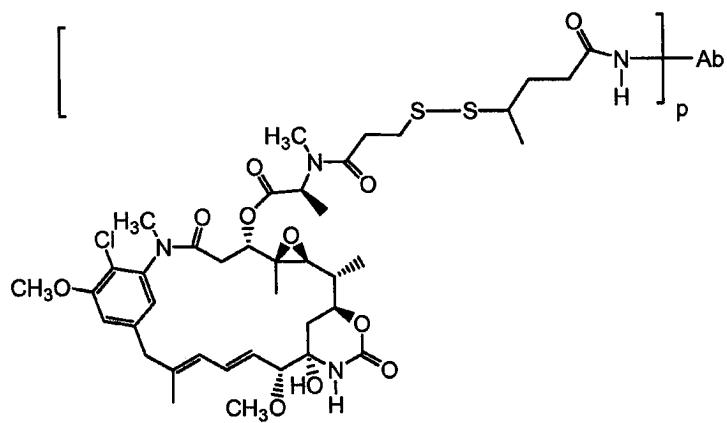
40

45

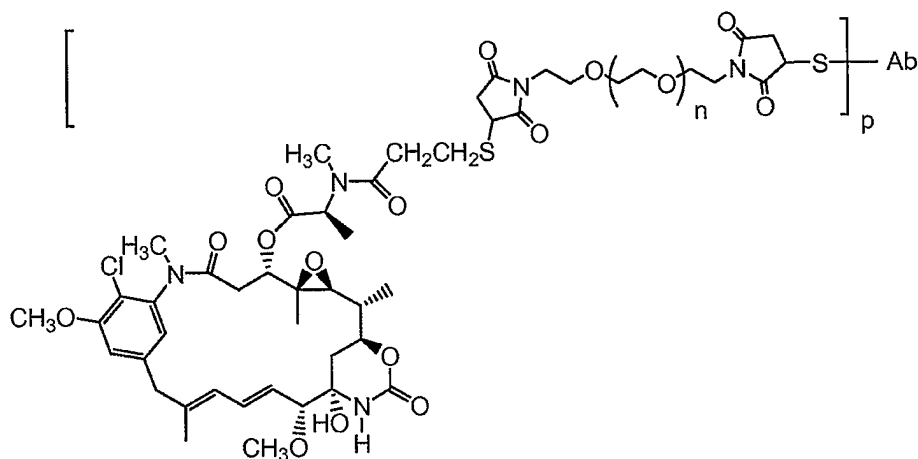


где волнистая линия означает ковалентное связывание атома серы молекулы лекарственного средства с линкером (L) конъюгата «антитело-лекарственное средство» (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A1).

Другие репрезентативные конъюгаты «маитанзиноид-антитело-лекарственное средство» имеют нижеследующие структуры и обозначения (где Ab представляет собой антитело, а p равно от 1 до примерно 8):



Репрезентативные конъюгаты ««антитело-лекарственное средство», где DM1
 45 присоединен посредством линкера ВМРЕО к тиоловой группе антитела, имеют
 нижеследующую структуру и обозначения:



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

Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение описаны, например, в публикации Erickson, et al. (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433; в патентах США №№ 5208020, 5416064, в заявке US 2005/0276812 A1 и в Европейском патенте EP 0425235B1, которые полностью вводятся в настоящую заявку посредством ссылки.

Конъюгаты «антитело-майтанзиноид» получают путем химического связывания антитела с молекулой майтанзиноида, где указанное связывание не приводит к значительному снижению биологической активности антитела или молекулы майтанзиноида. См., например, патент США № 5208020 (который во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). Майтанзиноиды могут быть синтезированы известными методами, либо они могут быть выделены из природных источников. Подходящие майтанзиноиды описаны, например, в патенте США № 5208020 и в других патентах и в непатентных публикациях, описанных выше, и такими майтанзиноидами являются майтанзинол и аналоги майтанзинола, имеющие модификации в ароматическом кольце или в других положениях молекулы майтанзинола, такие как различные сложные эфиры майтанзинола.

Для создания конъюгатов «антитело-майтанзиноид» может быть использовано множество линкерных групп, известных специалистам, включая, например, группы, описанные в патенте США № 5208020 или в Европейском патенте EP 0425235B1, и в публикации Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) и в заявке на патент США US 2005/016993 A1, которые полностью вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Конъюгаты «антитело-майтанзиноид», содержащие линкерный компонент SMCC, могут быть получены, как описано в заявке на патент США US 2005/0276812 A1, в разделе «Конъюгаты антитело-лекарственное средство и методы». Линкерными группами являются дисульфидные группы, тиоэфирные группы, группы, чувствительные к воздействию кислоты, фотохимически неустойчивые группы, группы, чувствительные к действию пептидазы, или группы, чувствительные к действию эстеразы, описанные в вышеупомянутых патентах. Дополнительные линкерные группы описаны и проиллюстрированы в настоящей заявке.

Конъюгаты «антитело-майтанзиноид» могут быть получены с использованием различных бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения

(такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В некоторых вариантах изобретения связывающими агентами для

5 создания дисульфидной связи являются N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) или N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP).

Линкер может быть присоединен к молекуле майтанзиноида в различных положениях, в зависимости от типа связи. Так, например, сложноэфирная связь может быть

10 образована посредством реакции с гидроксильной группой стандартными методами связывания. Такая реакция может осуществляться в положении С-3, имеющем гидроксильную группу, в положении С-14, модифицированном гидроксиметилом, в положении С-15, модифицированном гидроксильной группой, и в положении С-20, имеющем гидроксильную группу. В одном из вариантов изобретения указанная связь

15 образуется в положении С-3 майтанзинола или его аналога.

(2) Ауристатины и доластатины

В некоторых вариантах изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с доластатином или с пептидным аналогом доластатина или их производными, например, с ауристатином (патенты США №№ 5635483, 5780588). Было

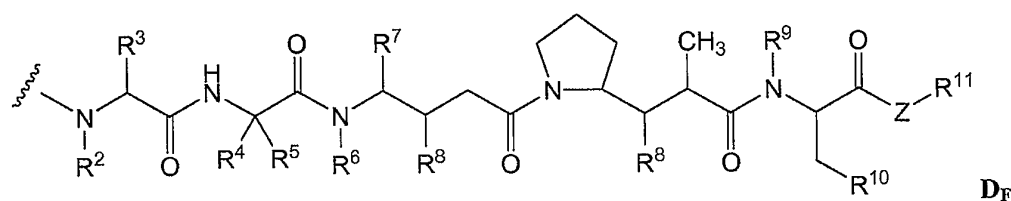
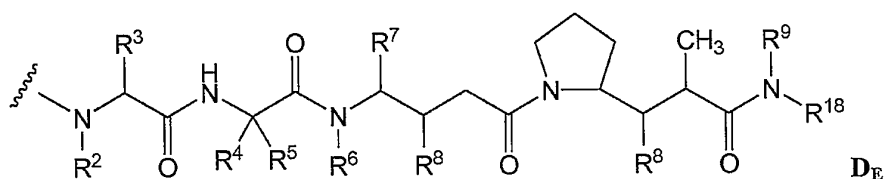
20 обнаружено, что доластатины и ауристатины негативно влияют на динамику образования микротрубочек, гидролиз GTP и деление ядер и клеток (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584), и обладают противораковой (патент США 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Молекулы доластатиновых или ауристатиновых лекарственных

25 средств могут быть присоединены к антителу у N-(амино)-конца или у C-(карбокси)-конца молекулы пептидного лекарственного средства (WO 02/088172).

Репрезентативными вариантами ауристатина являются молекулы лекарственного средства, содержащие присоединенный к N-концу монометилауристин, DE и DF (заявка US 2005/0238649, описанная Senter et al., Proceedings of the American Association

30 for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, и представленная 28 марта 2004 г., указанная заявка полностью вводится в настоящее описание посредством ссылки).

Пептидная молекула лекарственного средства может быть выбрана из соединений формул D_E и D_F, представленных ниже:



где волнистая линия в D_E и D_F обозначает сайт ковалентного присоединения к антителу или к компоненту антитело-линкер;

и в каждом положении, независимо:

R^2 выбран из Н и C_1 - C_8 алкила;

R^3 выбран из Н, C_1 - C_8 алкила, C_3 - C_8 карбоцикла, арила, C_1 - C_8 алкил-арила, C_1 - C_8 алкил- $(C_3$ - C_8 карбоцикла), C_3 - C_8 гетероцикла и C_1 - C_8 алкил- $(C_3$ - C_8 гетероцикла);

R^4 выбран из Н, C_1 - C_8 алкила, C_3 - C_8 карбоцикла, арила, C_1 - C_8 алкил-арила, C_1 - C_8 алкил- $(C_3$ - C_8 карбоцикла), C_3 - C_8 гетероцикла и C_1 - C_8 алкил- $(C_3$ - C_8 гетероцикла);

R^5 выбран из Н и метила;

или R^4 и R^5 , взятые вместе, образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу - $(CR^aR^b)_n$, где R^a и R^b независимо выбраны из Н, C_1 - C_8 алкила и C_3 - C_8 карбоцикла, а n выбран из 2, 3, 4, 5 и 6;

R^6 выбран из Н и C_1 - C_8 алкила;

R^7 выбран из Н, C_1 - C_8 алкила, C_3 - C_8 карбоцикла, арила, C_1 - C_8 алкил-арила, C_1 - C_8 алкил- $(C_3$ - C_8 карбоцикла), C_3 - C_8 гетероцикла и C_1 - C_8 алкил- $(C_3$ - C_8 гетероцикла);

каждый R^8 независимо выбран из Н, ОН, C_1 - C_8 алкила, C_3 - C_8 карбоцикла и О- $(C_1$ - C_8 алкила);

R^9 выбран из Н и C_1 - C_8 алкила;

R^{10} выбран из арила или C_3 - C_8 гетероцикла;

Z представляет собой О, S, NH или NR^{12} , где R^{12} представляет собой C_1 - C_8 алкил;

R^{11} выбран из Н, C_1 - C_{20} алкила, арила, C_3 - C_8 гетероцикла, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ или $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m равно целому числу 1-1000;

R^{13} представляет собой C_2 - C_8 алкил;

R^{14} представляет собой Н или C_1 - C_8 алкил;

R^{15} в каждом случае независимо представляет собой Н, $COOH$, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$ или $-(CH_2)_n-SO_3-C_1$ - C_8 алкил;

R^{16} в каждом случае независимо представляет собой Н, C_1 - C_8 алкил или $-(CH_2)_n-COOH$;

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

n равно целому числу от 0 до 6.

В одном из вариантов изобретения R^3 , R^4 и R^7 независимо представляют собой изопропил или втор-бутил, а R^5 представляет собой -Н или метил. В предпочтительном варианте изобретения каждый из R^3 и R^4 представляет собой изопропил, R^5 представляет собой -Н, а R^7 представляет собой втор-бутил.

В другом варианте изобретения каждый из R^2 и R^6 представляет собой метил, а R^9 представляет собой -Н.

В еще одном варианте изобретения R^8 в каждом случае представляет собой $-OCH_3$.

В репрезентативном варианте изобретения каждый из R^3 и R^4 представляет собой изопропил, каждый из R^2 и R^6 представляет собой метил, R^5 представляет собой $-H$, R^7 представляет собой втор-бутил, R^8 в каждом случае представляет собой $-OCH_3$, а R^9 представляет собой $-H$.

В одном из вариантов изобретения Z представляет собой $-O-$ или $-NH-$.

В одном из вариантов изобретения R^{10} представляет собой арил.

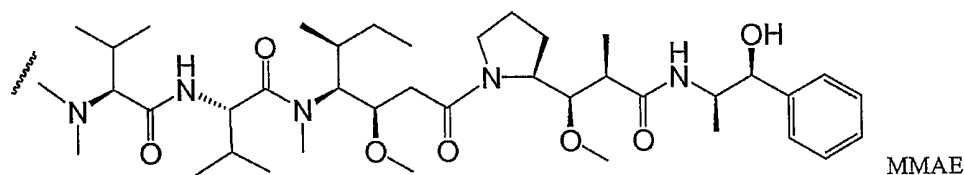
В репрезентативном варианте изобретения R^{10} представляет собой фенил.

В репрезентативном варианте изобретения, если Z представляет собой $-O-$, то R^{11} представляет собой $-H$, метил или трет-бутил.

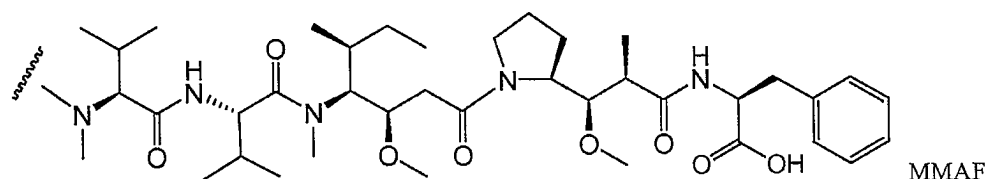
В одном из вариантов изобретения, если Z представляет собой $-NH-$, то R^{11} представляет собой $-CH(R^{15})_2$, где R^{15} представляет собой $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, а R^{16} представляет собой $-C_1-C_8$ алкил или $-(CH_2)_n-COOH$.

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

Репрезентативным вариантом ауристатина формулы D_E является MMAE, где волнистая линия означает ковалентное связывание конъюгата «антитело-лекарственное средство» с линкером (L):



Репрезентативным вариантом ауристатина формулы D_F является MMAF, где волнистая линия означает ковалентное связывание конъюгата «антитело-лекарственное средство» с линкером (L) (см. заявку US 2005/0238649 и публикацию Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124):

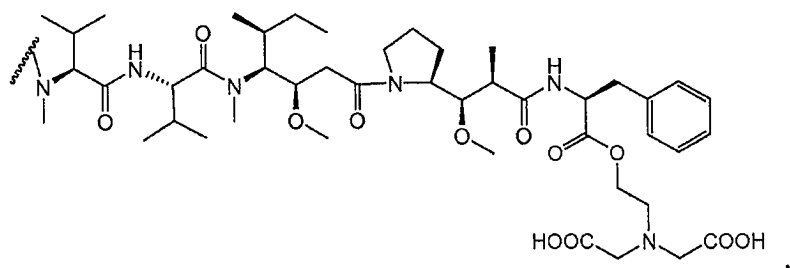


Другими репрезентативными вариантами являются монометилвалиновые соединения, имеющие фенилаланинкарбоксо-модификации у С-конца пентапептидного ауристатинового лекарственного средства (WO 2007/008848), и монометилвалиновые соединения, имеющие фенилаланиновые модификации боковой цепи у С-конца пентапептидного ауристатинового лекарственного средства (WO 2007/008603).

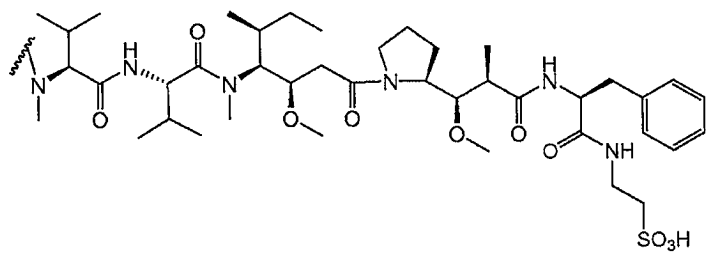
Другими молекулами лекарственного средства являются нижеследующие производные MMAF, где волнистая линия означает ковалентное связывание конъюгата «антитело-лекарственное средство» с линкером (L):



5

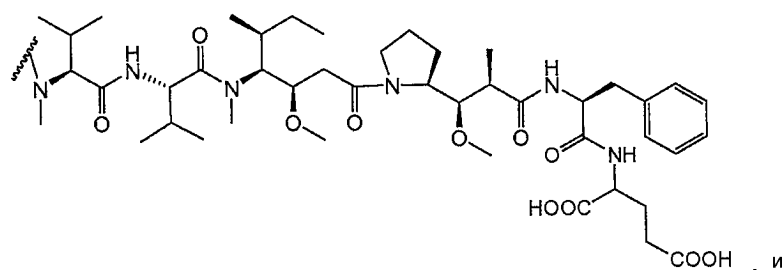


10



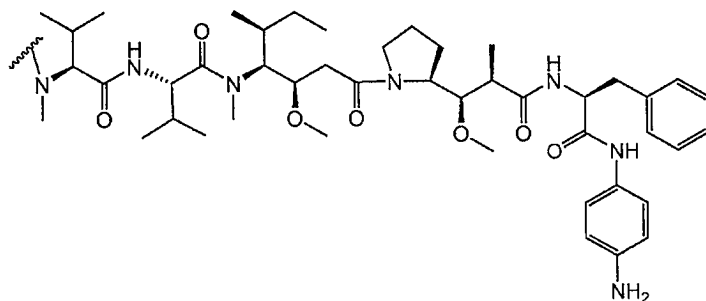
15

20



25

30



35

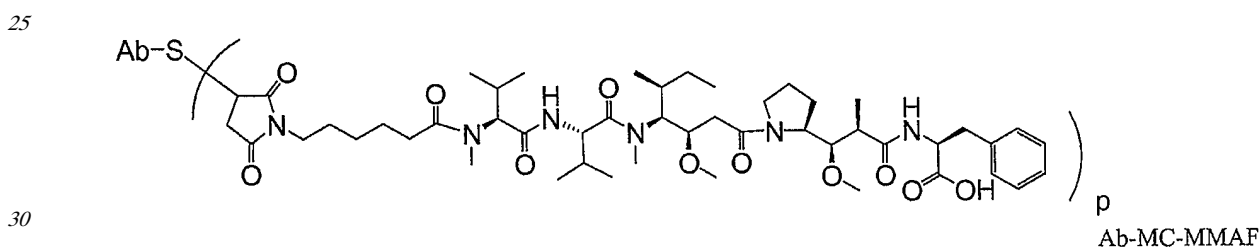
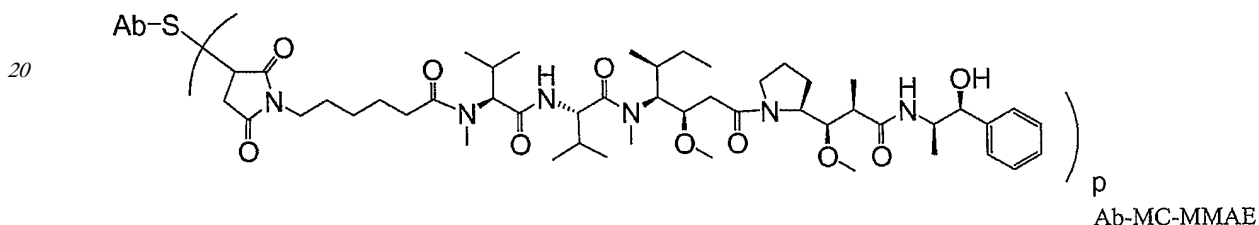
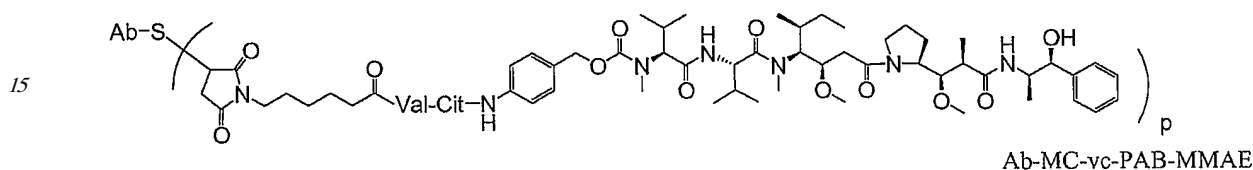
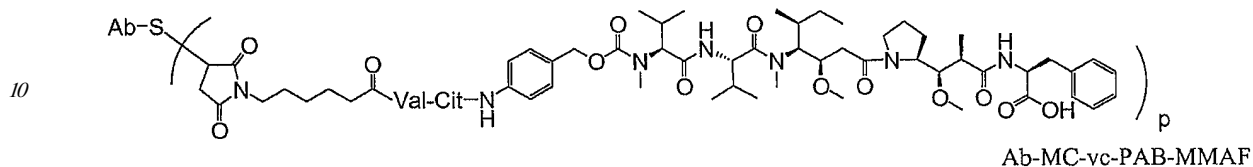
В одном из аспектов изобретения гидрофильными группами являются, но не ограничиваются ими, сложные эфиры триэтиленгликоля (TEG), представленные выше, которые могут быть присоединены к молекуле лекарственного средства в положении R¹¹. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, можно лишь отметить, что гидрофильные группы улучшают интернализацию молекулы лекарственного средства и предотвращают ее агрегацию.

40

45

Репрезентативные варианты ADC формулы I, содержащие ауристатин/доластатин или их производные, описаны в заявке US 2005-0238649 и в публикации Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124, которые полностью вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Репрезентативные варианты ADC формулы I, содержащие MMAE или MMAF и различные линкерные компоненты, имеют нижеследующие структуры и обозначения (где "Ab" представляет собой антитело; p равно от 1 до примерно 8, "Val-Cit" или "vc" представляет собой дипептид валин-цитруллин, а "S" представляет собой атом серы). При этом следует отметить, что в некоторых описаниях структуры ADC,

связанного с атомом серы, антитело имеет обозначение "Ab-S", которое указывает лишь на связь с атомом серы, но не указывает на то, что конкретный атом серы присоединен к нескольким молекулам «линкер-лекарственное средство». В нижеследующих структурах скобка слева может быть также поставлена слева от атома серы Ab и S, и такая запись будет эквивалентна формуле ADC согласно изобретению, представленной в настоящем описании.



Репрезентативные варианты ADC формулы I, содержащие MMAF и различные линкерные компоненты, также включают Ab-MC-PAB-MMAF и Ab-PAB-MMAF. Интересно отметить, что иммуноконъюгаты, содержащие MMAF, присоединенные к антителу посредством линкера, который не подвергается протеолитическому расщеплению, обладают активностью, сравнимой с активностью иммуноконъюгатов, содержащих MMAF, присоединенный к антителу посредством протеолитически расщепляемого линкера. См., Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. В таких случаях высвобождение лекарственного средства, очевидно, происходит благодаря разложению антитела в клетке. См. ниже.

Обычно пептидные молекулы лекарственного средства могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть образованы, например, методом синтеза в жидкой фазе (см. E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), хорошо известным специалистам в области пептидного синтеза. Молекулы ауристатиновых/доластатиновых лекарственных средств могут быть получены методами, описанными в заявке США US 2005-0238649 A1; в патентах США №№ 5635483; № 5780588; в публикациях Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996,

719-725; Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; и Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

В частности, молекулы ауристатиновых/доластатиновых лекарственных средств формулы D_F, таких как MMAF и их производные, могут быть получены методами, описанными в заявке США 2005-0238649 A1 и в публикации Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. Молекулы ауристатиновых/доластатиновых лекарственных средств формулы D_E, таких как MMAE и их производные, могут быть получены методами, описанными в публикации Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784. Молекулы «лекарственное средство-линкер» MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAВ-MMAF и MC-vc-PAВ-MMAE могут быть соответствующим образом синтезированы рутинными методами, например, как описано в публикации Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784, и в публикации патентной заявки № US 2005/0238649 A1, а затем они могут быть конъюгированы с представляющим интерес антителом.

(3) Калихеамицин

В других вариантах изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Антибиотики семейства калихеамицинов способны продуцировать двухцепочечные ДНК-разрывы в субпикомолярных концентрациях. Описание получения конъюгатов семейства калихеамицинов можно найти в патентах США №№ 5712354, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все патенты принадлежат компании American Cyanamid Company). Структурными аналогами калихеамицина, которые могут быть использованы в этих целях, являются, но не ограничиваются ими, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-ацетил- γ_1^I , PSAG и θ_1^I (см. Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутые патенты США, принадлежащие компании American Cyanamid). Другим противоопухолевым лекарственным средством, с которым может быть конъюгировано антитело, является средство QFA, которое представляет собой антифолат. Калихеамицин и QFA имеют внутриклеточные активные сайты и с трудом проходят через плазматическую мембрану. Поэтому поглощение этих агентов клетками путем интернализации, опосредуемой антителом, приводит к значительному усилению их цитотоксических эффектов.

с. Другие цитотоксические средства

Другими противоопухолевыми средствами, которые могут быть конъюгированы с антителом, являются BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил, семейство агентов, известных под общим названием комплекс LL-E33288, описанный в патентах США №№ 5053394, 5770710, а также эсперамицины (патент США № 5877296).

Ферментативно активными токсинами и их фрагментами, которые могут быть использованы в этих целях, являются А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (от *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белка диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. См., например, заявку WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 г.

В настоящем изобретении также рассматривается иммуноконъюгат, образуемый антителом и соединением, обладающим нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКазой).

В некоторых вариантах изобретения иммуноконъюгат может содержать

высокорadioактивный атом. Для продуцирования радиоактивно конъюгированных антител могут быть использованы различные радиоактивные изотопы. Примерами таких радионуклидов являются ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu. Если указанный иммуноконъюгат используется для детекции, то он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ или ^{123}I , или спин-метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (известной также как МР-визуализация, МРВ), такую как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиоактивные или другие метки могут быть включены в иммуноконъюгат известными методами. Так, например, пептид может быть синтезирован биологическими методами, либо он может быть синтезирован методом химического синтеза аминокислот с использованием подходящих аминокислотных предшественников, включающих, например, фтор-19 вместо водорода. Такие метки, как $^{99\text{m}}\text{Tc}$ или ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re и ^{111}In могут быть присоединены посредством цистеинового остатка пептида. Иттрий-90 может быть присоединен посредством лизинового остатка. Для введения йода-123 может быть применен метод IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57). Другие методы подробно описаны в публикации «Monoclonal Antibodies in Immunocintigraphy» (Chatal, CRC Press 1989).

В некоторых вариантах изобретения иммуноконъюгат может содержать антитело, конъюгированное с пролекарство-активирующим ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидиловое химиотерапевтическое средство, см. WO 81/01145) в активное лекарственное средство, такое как противораковое лекарственное средство. Такие иммуноконъюгаты могут быть использованы в антитело-зависимой опосредуемой ферментами пролекарственной терапии ("ADEPT"). Ферментами, которые могут быть конъюгированы с антителом, являются, но не ограничиваются ими, щелочные фосфатазы, которые могут быть использованы для превращения фосфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазы, которые могут быть использованы для превращения сульфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминаза, которая может быть использована для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противораковое лекарственное средство, а именно в 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза Serratia, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые могут быть использованы для превращения пептид-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, которые могут быть использованы для превращения пролекарств, содержащих D-аминокислотные заместители; углевод-расщепляющие ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, которые могут быть использованы для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β -лактамаза, которая может быть использована для превращения лекарственных средств, дериватизированных β -лактамами, в свободные лекарственные средства; и пенициллин-амидазы, такие как пенициллин V-амидаза или пенициллин G-амидаза, которые могут быть использованы для превращения лекарственных средств, дериватизированных у атомов азота амина феноксиацетильными или фелилацетильными группами, соответственно, в свободные лекарственные средства. Ферменты могут быть ковалентно присоединены к антителам методами рекомбинантных ДНК, хорошо известными специалистам. См., например, Neuberger et al., Nature, 312:604-608 (1984).

d. Загрузка лекарственного средства

Загрузка лекарственного средства обозначается p , то есть средним числом молекул лекарственного средства на антитело в молекуле формулы I. Загрузка лекарственного средства может составлять от 1 до 20 молекул лекарственного средства (D) на антитело.

- 5 Конъюгатами «антитело-лекарственное средство» (ADC) формулы I являются наборы антител, конъюгированных с различными молекулами лекарственного средства, от 1 до 20. Среднее число молекул лекарственного средства на антитело в препаратах ADC, полученных в результате реакций конъюгирования, может быть охарактеризовано стандартными средствами, такими как масс-спектрометрия, ELISA-анализ и ВЭЖХ.
- 10 Может быть также определено количественное распределение ADC, выраженное в « p ». В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика гомогенного ADC, где p представляет собой определенную величину, полученную для ADC с другой загрузкой лекарственного средства, могут быть осуществлены с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ или электрофореза. Так, например, фармацевтические композиции «антитело-
- 15 лекарственное средство» формулы I могут быть гетерогенной смесью таких конъюгатов с антителами, присоединенными к 1, 2, 3, 4 или более молекулам лекарственного средства.

- Для некоторых конъюгатов «антитело-лекарственное средство» p может ограничиваться числом сайтов связывания на антителе. Так, например, если
- 20 присоединение происходит посредством тиола цистеина, как в репрезентативных вариантах, описанных выше, то антитело может иметь только одну или несколько тиоловых групп цистеина, либо оно может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиоловых групп, посредством которых может присоединяться линкер. В некоторых вариантах изобретения более высокая загрузка лекарственного
- 25 средства, например, $p > 5$, может приводить к агрегации, нерастворимости, токсичности или к потере способности некоторых конъюгатов «антитело-лекарственное средство» проникать через клетки. В некоторых вариантах изобретения, загрузка лекарственного средства на ADC согласно изобретению составляет в пределах от 1 и до примерно 8; примерно от 2 до 6 или примерно от 3 до 5. Действительно, было показано, что для
- 30 некоторых ADC оптимальное отношение молекул лекарственного средства на антитело может составлять менее чем 8, а может составлять примерно от 2 до 5. См. заявку США 2005-0238649 A1.

- В некоторых вариантах изобретения молекулы лекарственного средства в количестве меньше теоретического максимума конъюгируют с антителом в процессе реакции
- 35 конъюгирования. Антитело может содержать, например, лизиновые остатки, которые не реагируют с промежуточным соединением «лекарственное средство-линкер» или с линкерным реагентом, обсуждаемыми ниже. Обычно антитела не содержат большого количества свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут быть связаны с молекулой лекарственного средства, и действительно,
- 40 большинство тиоловых групп цистеиновых остатков в антителах присутствуют в виде дисульфидных мостиков. В некоторых вариантах изобретения антитело может быть восстановлено под действием восстановителя, такого как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в условиях частичного или полного восстановления с образованием реакционноспособных тиоловых групп цистеина. В некоторых вариантах
- 45 изобретения антитело подвергают реакции в денатурирующих условиях с образованием реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Загрузка ADC (отношение лекарственное средство/антитело) может регулироваться различными методами, например, путем (i) ограничения молярного избытка

промежуточного соединения «лекарственное средство-линкер» или линкерного реагента по отношению к антителу, (ii) ограничения времени реакции или температуры реакции конъюгирования и (iii) неполного или лимитирующего восстановления для модификации тиоловых групп цистеина.

5 Следует отметить, что в случае, когда с промежуточным соединением «лекарственное средство-линкер» или с линкерным реагентом, а затем с реагентом, таким как молекула лекарственного средства, реагирует более чем одна нуклеофильная группа, то
10 полученным продуктом является смесь соединений ADC с распределением одной или более молекул лекарственного средства, присоединенных к антителу. Среднее число молекул лекарственного средства на антитело может быть вычислено для смеси с помощью «сэндвич»-ELISA-анализа с использованием антител, который является специфическим для антитела и для лекарственного средства. Отдельные молекулы ADC в этой смеси могут быть идентифицированы с помощью масс-спектропии и разделены с помощью ВЭЖХ, например, гидрофобной хроматографии (см. например, McDonagh
15 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
20 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). В некоторых вариантах изобретения гомогенный ADC с загрузкой одного лекарственного средства может быть выделен из смеси для конъюгирования с помощью электрофореза или хроматографии.

25 е. Некоторые способы получения иммуноконъюгатов

ADC формулы I может быть получен несколькими способами с проведением реакций органического химического синтеза в соответствующих условиях и с использованием реагентов, известных специалистам, где указанные способы включают: (1) реакцию
30 взаимодействия нуклеофильной группы антитела с двухвалентным линкерным реагентом с образованием Ab-L посредством ковалентной связи, а затем реакцию взаимодействия с молекулой лекарственного средства D; и (2) реакцию взаимодействия нуклеофильной группы молекулы лекарственного средства с двухвалентным линкерным реагентом с образованием D-L посредством ковалентной связи, а затем реакцию взаимодействия с нуклеофильной группой антитела. Репрезентативные методы получения ADC формулы
35 1 с помощью последней реакции описаны в заявке US 2005-0238649 A1, которая полностью вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Нуклеофильными группами, присутствующими на антителах, являются, но не ограничиваются ими: (i) N-концевые аминокислоты, (ii) аминокислоты боковой цепи, например, лизина, (iii) тиоловые группы боковой цепи, например, цистеина, и (iv)
40 гидроксильные или аминокислоты сахаров, где указанное антитело является гликозилированным. Аминокислоты, тиоловые группы и гидроксильные группы являются нуклеофильными и могут подвергаться реакции взаимодействия с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных молекулах или линкерных реагентах, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как NHS-эфиры, NOBt-эфиры, галогенформаты и галогенангидриды кислот; (ii) алкил- и
45 бензилгалогениды, такие как галогенангидриды кислот; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы. Некоторые антитела имеют восстанавливаемые межцепочечные дисульфиды, то есть цистеиновые мостики. Для конъюгирования с линкерными

реагентами антитела могут быть сделаны реакционноспособными путем их обработки восстановителем, таким как DTT (дителиотреитол) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), в результате чего такие антитела будут полностью или частично восстановленными.

Каждый цистеиновый мостик, теоретически, может образовывать два

5 реакционноспособных тиоловых нуклеофила. В антитела могут быть введены дополнительные нуклеофильные группы посредством модификации лизиновых остатков, например, посредством реакции взаимодействия лизинов с 2-иминотиолоном (реагентом Траута), что будет приводить к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиоловые группы могут быть включены в антитело путем введения одного, двух, трех, 10 четырех или более цистеиновых остатков (например, получения вариантов антител, содержащих один или несколько не природных цистеиновых аминокислотных остатков).

Конъюгаты “антитело-лекарственное средство” согласно изобретению могут быть также получены путем реакции взаимодействия электрофильной группы антитела, такой как карбонильная группа альдегида или кетона, с нуклеофильной группой 15 линкерного реагента или лекарственного средства. Подходящими нуклеофильными группами на линкерном реагенте являются, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, амино, гидразин, тиосемикарбазон, карбоксилат гидразина и арилгидразид. В одном из вариантов изобретения антитело модифицируют так, чтобы оно включало электрофильные группы, способные реагировать с нуклеофильными заместителями 20 на линкерном реагенте или лекарственном средстве. В другом варианте изобретения сахара гликозилированных антител могут быть окислены, например, периодатными окислителями с образованием альдегидных или кетоновых групп, которые могут реагировать с аминогруппой линкерных реагентов или молекул лекарственного средства. Полученные иминовые группы шиффа основания могут образовывать стабильную 25 связь, либо они могут быть восстановлены, например, борогидридными реагентами с образованием стабильных аминовых связей. В одном из вариантов изобретения реакция взаимодействия углеводной части гликозилированного антитела с галактозооксидазой или с метапериодатом натрия может приводить к образованию карбонильных (альдегидных и кетоновых) групп в антителе, которые могут реагировать с 30 соответствующими группами на лекарственном средстве (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте изобретения антитела, содержащие N-концевые сериновые или треониновые остатки, могут реагировать с метапериодатом натрия с образованием альдегида вместо первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh (1992), Bioconjugate Chem. 3:138-146; патент США № 5362852). Такой альдегид может 35 взаимодействовать с молекулой лекарственного средства или с линкерным нуклеофилом.

Нуклеофильными группами на молекуле лекарственного средства являются, но не ограничиваются ими, аминогруппы, тиольные, гидроксильные, гидразидные, оксимовые, гидразиновые, тиосемикарбазоновые, гидразинкарбоксилатные и арилгидразидные группы, способные реагировать, с образованием ковалентных связей, с 40 электрофильными группами на линкерных молекулах и линкерных реагентах, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как NHS-эфиры, HOBT-эфиры, галогенформиаты и галогенангидриды кислот; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы.

Короче говоря, рассматриваемыми соединениями согласно изобретению являются, 45 но не ограничиваются ими: ADC, полученные с использованием нижеследующих перекрестно-сшивающих реагентов, таких как BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, и SVSB

(сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, поставляются Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A; см. страницы 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog).

Иммуноконъюгаты, содержащие антитело и цитотоксическое средство, могут быть получены с использованием различных бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Так, например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в публикации Vitetta et al. Science, 238:1098 (1987). ¹⁴C-меченая 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) является репрезентативным хелатообразующим агентом для конъюгирования радионуклида с антителом. См. WO 94/11026.

Альтернативно гибридный белок, содержащий антитело и цитотоксическое средство, может быть получен, например, рекомбинантными методами или методом пептидного синтеза. Рекомбинантная молекула ДНК может содержать области, кодирующие антитело и цитотоксические части конъюгата, либо смежные друг с другом, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который не оказывает негативного влияния на желаемые свойства данного конъюгата.

В еще одном варианте изобретения указанное антитело может быть конъюгировано с “рецептором” (таким как стрептавидин) для его предварительного нацеливания на опухоль, где указанный конъюгат “антитело-рецептор” вводят пациенту с последующим удалением несвязанного конъюгата из кровотока с использованием агента для клиренса, а затем вводят “лиганд” (например, авидин), конъюгированный с цитотоксическим средством (например, радионуклеотидом).

Репрезентативные иммуноконъюгаты - конъюгаты «тио-антитело-лекарственное средство»

а. Получение сконструированных на основе цистеина анти-CD79b антител

ДНК, кодирующую вариант аминокислотной последовательности сконструированных на основе цистеина анти-CD79b антител и родительских анти-CD79b антител согласно изобретению, получают различными методами, которые включают, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае природных вариантов аминокислотных последовательностей), получение препарата с помощью сайт-направленного (или олигонуклеотид-опосредуемого) мутагенеза (Carter (1985) et al. Nucleic Acids Res. 13:4431-4443; Ho et al. (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260), PCR mutagenesis (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; and Vallette et al. (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733), и кластерного мутагенеза (Wells et al. (1985) Gene 34:315-323) ранее полученной ДНК, кодирующей полипептид. Протоколы, наборы и реагенты для осуществления мутагенеза являются коммерчески доступными, например, такие как набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Одиночные мутации также вводят с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием двухцепочечной плазмидной ДНК в

качестве матрицы посредством ПЦР-мутагенеза (Sambrook and Russel, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; Zoller et al. (1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500). Варианты рекомбинантных антител могут быть также сконструированы путем модификации рестрикционными фрагментами или с помощью удлиняющей ПЦР с перекрыванием, проводимой с использованием синтетических олигонуклеотидов. Мутагенные праймеры кодируют замену(ы) цистеиновых кодонов. Стандартные методы мутагенеза могут быть применены для продуцирования ДНК, кодирующей такие мутантные антитела, сконструированные на основе цистеина (Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; и Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993).

Технология фагового представления (McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-553) может быть использована для продуцирования человеческих анти-CD79b антител и фрагментов антител *in vitro* из наборов генов варибельного домена иммуноглобулина (V) от неиммунизированных доноров. В соответствии с этим методом, гены домена V антител клонируют с сохранением рамки считывания в мажорный или минорный ген белковой оболочки нитчатого фага, такого как M13 или fd, и представляют на поверхности фаговой частицы как функциональные фрагменты антител. Поскольку нитчатая частица содержит копию одноцепочечной ДНК генома фага, то отбор, проводимый на основе функциональных свойств антитела, также позволяет отбирать ген, кодирующий антитело, обладающее этими свойствами. Таким образом, фag имитирует некоторые свойства B-клеток (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).

Анти-CD79b антитела могут быть химически синтезированы с применением известного метода олигопептидного синтеза, либо они могут быть получены и очищены рекомбинантным методом. Соответствующая аминокислотная последовательность или ее части могут быть получены методом прямого твердофазного синтеза пептидов (Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). Синтез белка *in vitro* может быть осуществлен вручную или автоматизированным методом. Автоматизированный метод твердофазного синтеза может быть осуществлен, например, с использованием t-BOC- или Fmoc- защищенных аминокислот на пептидном синтезаторе Applied Biosystems (Foster City, CA) в соответствии с инструкциями производителей. Различные части анти-CD79b антитела или полипептида CD79b могут быть получены методом химического синтеза и комбинированным методом химического или ферментативного синтеза с продуцированием нужного анти-CD79b антитела или полипептида CD79b.

Для получения фрагментов антитела были разработаны различные методы. Традиционно, эти фрагменты образуются в результате протеолитического расщепления интактных антител (Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) и Brennan et al. (1985) *Science*, 229:81), либо они могут продуцироваться непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты анти-CD79b антител могут экспрессироваться в *E. coli* и секретироваться из *E. coli*, что облегчает продуцирование этих фрагментов в большом количестве. Фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше.

Альтернативно Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно выделены из *E. coli* и

химически связаны с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)), либо они могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Анти-CD79b антителом может быть одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) (WO 93/16185; US 5571894; US 5587458). Фрагментом анти-CD79b антитела может быть также «линейное антитело» (US 5641870). Такие фрагменты линейных антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Ниже описано, главным образом, продуцирование анти-CD79b антител путем культивирования клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CD79b антитело. ДНК, кодирующая анти-CD79b антитела, может быть получена из библиотеки кДНК, выделенной из ткани, которая, как очевидно, содержит мРНК анти-CD79b антитела и экспрессирует ее на детектируемом уровне. В соответствии с этим, ДНК человеческого анти-CD79b антитела или полипептида CD79b обычно может быть получена из библиотеки кДНК, выделенной из человеческой ткани. Ген, кодирующий анти-CD79b антитело, может быть также получен из геномной библиотеки или с применением известных методов синтеза (например, автоматизированного синтеза нуклеиновых кислот).

Способы конструирования, отбора и получения препаратов согласно изобретению позволяют получать сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела, которые реагируют с электрофильной функциональной группой. Эти методы также позволяют получать соединения-конъюгаты антител, такие как соединения-конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (ADC), с молекулами лекарственных средств в определенных, сконструированных селективных сайтах. Реакционноспособные цистеиновые остатки на поверхности антитела позволяют осуществлять специфическое конъюгирование молекулы лекарственного средства посредством реагирующей с тиолом группы, такой как малеимид или галогенацетил. Нуклеофильная реактивность тиоловых функциональных групп остатка Cys с малеимидной группой приблизительно в 1000 раз выше, чем реактивность любых других функциональных групп аминокислот в белке, таких как аминокислотная группа лизинового остатка или N-концевая аминокислотная группа. Тиол-специфическая функциональная группа в йодацетильных и малеимидных реагентах может реагировать с аминокислотными группами, но при более высоком pH (>9,0), и такая реакция занимает больше времени (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). Количество свободного тиола в белке может быть оценено с помощью стандартного анализа Элмана. Иммуноглобулин М является примером дисульфид-связанного пентамера, а иммуноглобулин G является примером белка с внутренними дисульфидными мостиками, связанными с субъединицами. В белках, таких как указанный белок, для продуцирования реакционноспособного свободного тиола необходимо восстановление дисульфидных связей под действием реагента, такого как дитиотреитол (DTT) или селен (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-156). Такая процедура может приводить к потере третичной структуры антитела и специфичности связывания с антигеном.

Анализ PHESELECTOR (фаговый ELISA для отбора реакционноспособных тиолов) позволяет детектировать реакционноспособные цистеиновые группы в антителах в формате фагового ELISA, что облегчает конструирование антител на основе цистеина (Junutula, J.R. et al. (2008) J. Immunol Methods 332:41-52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). На поверхности лунок наносят сконструированное на основе цистеина антитело, а затем инкубируют с фаговыми частицами и добавляют ПХ-меченое «второе» антитело с последующим определением оптической плотности. Мутантные белки, представленные

на фаге, могут быть скринированы быстрым, надежным и высокоэффективным методом. Этим же самым методом могут быть получены библиотеки сконструированных на основе цистеина антител, которые могут быть подвергнуты селективному связыванию для идентификации включения соответствующих реактивных сайтов свободных Cys из рандомизированных фаговых библиотек белков антител или других белков. Этот метод включает проведение реакции цистеиновых мутантных белков, представленных на фаге, с аффинным реагентом или репортерной группой, которая также взаимодействует с тиолом.

Анализ PHESELECTOR позволяет осуществлять скрининг реакционноспособных тиоловых групп в антителах. В качестве примера может служить идентификация варианта A121C этим методом. Для идентификации большего числа вариантов тимо-Fab с реакционноспособными тиоловыми группами может быть проведен эффективный поиск полноразмерной молекулы Fab. Для идентификации и количественной оценки доступности растворителя для аминокислотных остатков в полипептиде был использован такой параметр, как относительная доступность поверхности. Доступность поверхности может быть выражена как площадь поверхности (\AA^2), которая может контактировать с молекулой растворителя, например, с водой. Пространство, занятое водой, выражают приблизительно как сферу радиусом 1,4 \AA . В пакете кристаллографических программ CCP4, которые являются либо бесплатными, либо требуют лицензионной оплаты (Компании по разработке программы CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA44AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, или по интернету: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html), используются алгоритмы для вычисления поверхностной доступности каждой аминокислоты белка с известными рентгеноструктурными кристаллографическими координатами ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763). Двумя репрезентативными программными модулями, с помощью которых проводят вычисления поверхностной доступности, являются программы "AREAIMOL" и "SURFACE", разработанные на основе алгоритмов B. Lee & F.M.Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400. Программа AREAIMOL позволяет определять доступность поверхности белка для растворителя как точку центра сферы зонда (представляющего молекулу растворителя), когда эта точка «обкатывает» ван-дер-ваальсовскую поверхность белка. Программа AREAIMOL позволяет вычислять площадь поверхности, доступную для растворителя, путем генерирования точек поверхности на большой сфере вокруг каждого атома (на расстоянии от центра атома, равном сумме радиусов атома и зонда) и элиминации тех точек, которые находятся в эквивалентных сферах, ассоциированных с соседними атомами. Программа AREAIMOL позволяет определять доступную для растворителя площадь атомов в PDB-файле координат и систематизировать доступную площадь остатка, цепи и всей молекулы. Площади (или разности площадей), доступные для отдельных атомов, могут быть зарегистрированы в выходном псевдо-PDB-файле. Программа AREAIMOL использует только один радиус для каждого элемента и распознает только ограниченное число различных элементов.

Программы AREAIMOL и SURFACE позволяют достигать абсолютную доступность, то есть число ангстрем (\AA) в квадрате. Относительную доступность поверхности вычисляют по сравнению с доступностью стандартного пептида с характерными аминокислотами в данном полипептиде. Стандартным пептидом является трипептид Gly-X-Gly, где X означает представляющую интерес аминокислоту, и данный стандартный пептид должен иметь «удлиненную» конформацию, то есть конформацию, подобную бета-цепям. Такая удлиненная конформация максимизирует доступность

остатка X. Вычисленную доступную площадь делят на доступную площадь для стандартного пептида в трипептиде Gly-X-Gly и получают частное, которое представляет собой относительную доступность. Процент доступности представляет собой относительную доступность, умноженную на 100. Другой репрезентативный алгоритм для вычисления доступности поверхности основан на SOLV-модуле программы xsaе (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel), которая позволяет вычислять относительную доступность аминокислотного остатка для водной сферы, исходя из рентгенографических координат данного полипептида. Относительная доступность поверхности для каждой аминокислоты в антителе может быть вычислена с использованием данных о его кристаллической структуре (Eigenbrot et al. (1993) *J. Mol. Biol.* 229:969-995).

ДНК, кодирующая сконструированные на основе цистеина антитела, может быть легко выделена и секвенирована в соответствии со стандартными процедурами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Гибридомные клетки служат в качестве источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или другие клетки-хозяева млекопитающих, такие как миеломные клетки (патент США 5807715; заявки на патент США 2005/0048572 и 2004/0229310), которые обычно не продуцируют белок антитела, в результате чего в этих рекомбинантных клетках-хозяевах синтезируются моноклональные антитела.

После конструирования и отбора, сконструированные на основе цистеина антитела, например, тио-Fab, имеющие в высокой степени реакционноспособные неспаренные остатки Cys, а именно «свободные цистеиновые аминокислотные остатки», могут быть получены путем (i) экспрессии в бактериях, например, в *E. coli*-системе (Skerra et al. (1993) *Curr. Opin. in Immunol.* 5:256-262; Plückthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151-188) или в системе клеточной культуры млекопитающих (WO 01/00245), например, в клетках яичника китайского хомячка (CHO); и (ii) очистки стандартными методами очистки белка (Lowman et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17):10982-10988).

Тиоловые группы сконструированного Cys реагируют с электрофильными линкерными реагентами и с промежуточными соединениями «лекарственное средство-линкер» с образованием конъюгатов «сконструированное на основе цистеина антитело-лекарственное средство» и других меченых антител, сконструированных на основе цистеина. Остатки Cys, которые присутствуют в сконструированных на основе цистеина антителах и в родительских антителах, и которые спариваются и образуют межцепевые и внутрицепевые дисульфидные связи, не имеют каких-либо реакционноспособных тиоловых групп (если только они не обработаны восстановителем) и не реагируют с электрофильными линкерными реагентами или с промежуточными соединениями «лекарственное средство-линкер». Только что введенный остаток Cys может оставаться неспаренным, и может реагировать, то есть образовывать конъюгат с электрофильным линкерным реагентом или промежуточным соединением «лекарственное средство-линкер», таким как «лекарственное средство-малеимид». Репрезентативными промежуточными соединениями «лекарственное средство-линкер» является MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE и MC-vc-PAB-MMAF. Структурные положения сконструированных остатков Cys в тяжелой и легкой цепях пронумерованы согласно системе последовательной нумерации. Такая система последовательной нумерации коррелирует с системой нумерации Кэбата (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of*

Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), начиная с N-конца, по сравнению со схемой нумерации по Кэбату (нижний ряд), где вставки обозначены a,b,c. С использованием системы нумерации Кэбата, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее или большее

5 число аминокислот вследствие укорочения или вставки в FR или CDR варибельного домена. Сайты сконструированных на основе цистеина вариантов тяжелой цепи идентифицируют с применением схемы последовательной нумерации и схемы нумерации Кэбата.

В одном из вариантов изобретения сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело получают способом, включающим:

10

(a) замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского анти-CD79b антитела цистеином; и

(b) определение реакционной способности тиоловых групп цистеина анти-CD79b антитела посредством реакции взаимодействия сконструированного на основе цистеина

15 антитела с реагентом, реагирующим с тиолом.

Сконструированное на основе цистеина антитело может реагировать с реагентом, реагирующим с тиолом, лучше, чем родительское антитело.

Свободные цистеиновые аминокислотные остатки могут быть локализованы в тяжелых или легких цепях, или в константном или варибельном доменах. Фрагменты

20 антител, например Fab, могут быть также сконструированы путем замены одной или нескольких аминокислот фрагмента антитела одной или несколькими цистеиновыми аминокислотами, с образованием сконструированных на основе цистеина фрагментов антител.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к способу получения

25 (создания) сконструированного на основе цистеина анти-CD79b антитела, где указанный способ включает:

(a) введение одной или нескольких цистеиновых аминокислот в родительское анти-CD79b антитело с получением сконструированного на основе цистеина анти-CD79b

антитела; и

(b) определение способности тиоловой группы сконструированного на основе цистеина антитела реагировать с реагентом, реагирующим с тиолом;

30

где указанное сконструированное на основе цистеина антитело может реагировать с реагентом, реагирующим с тиолом, лучше, чем родительское антитело.

Стадия (a) способа получения сконструированного на основе цистеина антитела

35 может включать:

(i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированное на основе цистеина антитело;

(ii) экспрессию сконструированного на основе цистеина антитела; и

(iii) выделение и очистку указанного сконструированного на основе цистеина

40 антитела.

Стадия (b) способа получения сконструированного на основе цистеина антитела может включать экспрессию сконструированного на основе цистеина антитела на вирусной частице, выбранной из фага или фагмидной частицы.

Стадия (b) способа получения сконструированного на основе цистеина антитела

45 может также включать:

(i) реакцию взаимодействия сконструированного на основе цистеина антитела с аффинным реагентом, реагирующим с тиолом, с получением аффинно меченного сконструированного на основе цистеина антитела; и

(ii) измерение уровня связывания аффинно меченного, сконструированного на основе цистеина антитела со средой для захвата.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к способу скрининга сконструированных на основе цистеина антител, имеющих в высокой степени
 5 реакционноспособные неспаренные цистеиновые аминокислоты, на реакционную способность их тиоловых групп, где указанный способ включает:

(a) введение одной или нескольких цистеиновых аминокислот в родительское антитело с получением сконструированного на основе цистеина антитела;

(b) реакцию взаимодействия сконструированного на основе цистеина антитела с
 10 аффинным реагентом, реагирующим с тиолом, с получением аффинно меченного, сконструированного на основе цистеина антитела;

(c) измерение уровня связывания аффинно меченного, сконструированного на основе цистеина антитела со средой для захвата; и

(d) определение способности тиоловой группы сконструированного на основе
 15 цистеина антитела реагировать с реагентом, реагирующим с тиолом.

Стадия (a) способа скрининга сконструированных на основе цистеина антител может включать:

(i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей
 сконструированное на основе цистеина антитело;

20 (ii) экспрессию сконструированного на основе цистеина антитела; и

(iii) выделение и очистку указанного сконструированного на основе цистеина антитела.

Стадия (b) способа скрининга сконструированных на основе цистеина антител может включать экспрессию сконструированного на основе цистеина антител на вирусной
 25 частице, выбранной из фага или фагмидной частицы.

Стадия (b) способа скрининга сконструированного на основе цистеина антитела может также включать:

(i) реакцию взаимодействия сконструированного на основе цистеина антитела с аффинным реагентом, реагирующим с тиолом, с получением аффинно меченного,
 30 сконструированного на основе цистеина антитела; и

(ii) измерение уровня связывания аффинно меченного, сконструированного на основе цистеина антитела со средой для захвата.

b. Конструирование вариантов анти-CD79b IgG на основе цистеина

Цистеин был введен в положение 118 тяжелой цепи (в соответствии с Европейской
 35 системой нумерации) (эквивалентное положению 118 тяжелой цепи, последовательная нумерация) в полноразмерные химерные родительские моноклональные анти-CD79b антитела или в положение 205 легкой цепи (в соответствии с нумерацией по Кэбату) (эквивалентное положению 209 легкой цепи, последовательная нумерация) в полноразмерные химерные родительские моноклональные анти-CD79b антитела
 40 методами введения цистеина, описанными в настоящей заявке.

Были получены нижеследующие, сконструированные на основе цистеина антитела, содержащие цистеин в положении 118 тяжелой цепи (в соответствии с Европейской системой нумерации): (a) тию-MA79b.v17-NC(A118C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 228) и с последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 229), фигура
 45 24; (b) тию-MA79b.v18-NC(A118C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 230) и с последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 231), фигура 25; (c) тию-MA79b.v28-NC(A118C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 232) и с последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 233), фигура 26; (d) тию-MA79b-NC

(A118C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 236) и с последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 237), фигура 28; и (е) тιο-анти-супоCD79b-HC(A118C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 244) и с последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 245), фигура 48.

- 5 Были получены нижеследующие, сконструированные на основе цистеина антитела, содержащие цистеин в положении 205 легкой цепи (в соответствии с нумерацией по Кэбату): (а) тιο-MA79b-LC(V205C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 234) и с последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 235), фигура 27; и (b) тιο-анти-супоCD79b(ch10D10)-LC(V205C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 299) и с последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 300), фигура 49.

Эти сконструированные на основе цистеина моноклональные антитела были экспрессированы в клетках CHO (яичника китайского хомячка) путем временной ферментации в среде, содержащей 1 mM цистеин.

- 15 В одном из вариантов изобретения гуманизированные сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела MA79b содержат одну или несколько нижеследующих последовательностей тяжелой цепи со свободной цистеиновой аминокислотой (SEQ ID NO: 251-259, таблица 2).

20 Таблица 2
Сравнение последовательностей тяжелой цепи гуманизированных сконструированных на основе цистеина вариантов анти-CD79b антитела MA79b, пронумерованных в соответствии с последовательной системой нумерации, нумерацией по Кэбату и Европейской системой нумерации

Последовательность	Последовательная нумерация	Нумерация по Кэбату	по	Европейская система нумерации	SEQ ID NO:
EVQLCESGGG	V5C	V5C			251
LRLSCCASYT	A23C	A23C			252
MNSLRCEDTAV	A88C	A84C			253
25 TLVTVCSASTK	S116C	S112C			254
VTVSSCSTKGP	A118C	A114C		A118C	255
VSSASCCKGPSV	T120C	T116C		T120C	256
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C		V282C	257
KGFYPCDIAVE	S375C	S371C		S375C	258
30 PPVLDCDGSFF	S400C	S396C		S400C	259

- 30 В одном из вариантов изобретения химерные сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела MA79b содержат одну или несколько нижеследующих последовательностей тяжелой цепи со свободной цистеиновой аминокислотой (SEQ ID NO: 260-268, таблица 3).

35 Таблица 3
Сравнение последовательностей тяжелой цепи сконструированных на основе цистеина вариантов анти-CD79b антитела chMA79b, пронумерованных в соответствии с последовательной системой нумерации, нумерацией по Кэбату и Европейской системой нумерации

Последовательность	Последовательная нумерация	Нумерация по Кэбату	Европейская система нумерации	SEQ ID NO:
EVQLCQSGAE	Q5C	Q5C		260
40 VKISCCATGYT	K23C	K23C		261
LSSLTCEDSAV	S88C	S84C		262
TSVTVCASASTK	S116C	S112C		263
VTVSSCSTKGP	A118C	A114C	A118C	264
VSSASCCKGPSV	T120C	T116C	T120C	265
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	266
45 KGFYPCDIAVE	S375C	S371C	S375C	267
PPVLDCDGSFF	S400C	S396C	S400C	268

В одном из вариантов изобретения химерные сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела, а именно анти-супоCD79b(ch10D10), содержат одну или несколько

нижеследующих последовательностей тяжелой цепи со свободной цистеиновой аминокислотой (SEQ ID NO: 269-277, таблица 4).

Таблица 4
Сравнение последовательностей тяжелой цепи сконструированных на основе цистеина вариантов анти-CD79b антитела, анти-супоCD79b(ch10D10), пронумерованных в соответствии с последовательной системой нумерации, нумерацией по Кэбату и Европейской системой нумерации

Последовательность	Последовательная нумерация	Нумерация по Кэбату	по Европейской системе нумерации	SEQ ID NO:
EVQLCESGPG	Q5C	Q5C		269
LSLTCCVTGYS	T23C	T23C		270
LNSVTCEDTAT	S88C	S84C		271
TTTLTVCSASTK	S111C	S112C		272
LTVSSCSTKGP	A113C	A114C	A118C	273
VSSASCKGPSV	T115C	T116C	T120C	274
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	275
KGFYPCDIAVE	S370C	S371C	S375C	276
PPVLDCDGSFF	S395C	S396C	S400C	277

В одном из вариантов изобретения гуманизированные сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела МА79b содержат одну или несколько нижеследующих последовательностей легкой цепи со свободной цистеиновой аминокислотой (SEQ ID NO: 278-284, таблица 5).

Таблица 5
Сравнение последовательностей легкой цепи гуманизированных сконструированных на основе цистеина вариантов анти-CD79b антитела МА79b, пронумерованных в соответствии с последовательной системой нумерации и нумерацией по Кэбату

Последовательность	Последовательная нумерация	Нумерация по Кэбату	SEQ ID NO:
SLSASCGRDVT	V15C	V15C	278
EIKRTCAAPSV	V114C	V110C	279
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	280
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	281
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	282
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	283
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	284

В одном из вариантов изобретения химерные сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела МА79b содержат одну или несколько нижеследующих последовательностей легкой цепи со свободной цистеиновой аминокислотой (SEQ ID NO: 285-291, таблица 6).

Таблица 6
Сравнение последовательностей легкой цепи химерных сконструированных на основе цистеина вариантов анти-CD79b антитела МА79b, пронумерованных в соответствии с последовательной системой нумерации и нумерацией по Кэбату

Последовательность	Последовательная нумерация	Нумерация по Кэбату	SEQ ID NO:
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	285
ELKRTCAAPSV	V114C	V110C	286
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	287
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	288
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	289
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	290
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	291

В одном из вариантов изобретения сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела, а именно анти-супоCD79b(ch10D10), содержат одну или несколько нижеследующих последовательностей легкой цепи со свободной цистеиновой аминокислотой (SEQ ID NO: 292-298, таблица 7).

Таблица 7
Сравнение последовательностей легкой цепи сконструированных на основе цистеина вариантов анти-CD79b антитела, анти-

--	--	--	--

сyноCD79b(ch10D10), пронумерованных в соответствии с последовательной системой нумерации и нумерацией по Кэбату			
Последовательность	Последовательная нумерация	Нумерация по Кэбату	SEQ ID NO:
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	292
EIKRTCAAPSV	V114C	V110C	293
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	294
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	295
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	296
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	297
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	298

c. Меченые и сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела

Сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела могут быть сайт-специфически и эффективно присоединены к реагенту, реагирующему с тиолом. Реагентом, реагирующим с тиолом, может быть многофункциональный линкерный реагент для захвата, то есть реагент, используемый в качестве аффинной метки (например, реагент «биотин-линкер»), детектируемая метка (например, реагент флуорофор), реагент для иммобилизации на твердой фазе (например, SEPHAROSE™, полистирол или стекло) или промежуточное соединение «лекарственное средство-линкер». Одним из примеров реагента, реагирующего с тиолом, является N-этилмалеимид (NEM). В репрезентативном варианте изобретения, в результате реакции взаимодействия тио-Fab с реагентом «биотин-линкер» образуется биотинилированный тио-Fab, посредством которого могут быть детектированы и определены присутствие и реакционная способность введенного цистеинового остатка. В результате реакции взаимодействия тио-Fab с многофункциональным линкерным реагентом образуется тио-Fab с функциональным линкером, который может также реагировать с молекулой лекарственного средства или другой меткой. В результате реакции взаимодействия тио-Fab с промежуточным соединением «лекарственное средство-линкер» образуется конъюгат «тио-Fab-лекарственное средство».

Описанные здесь репрезентативные способы могут быть применены, в основном для идентификации и продуцирования антител, а в основном других белков, путем проведения описанных здесь стадий конструирования и скрининга.

Такой способ может быть применен для конъюгирования других реагирующих с тиолом реагентов, в которых реакционноспособной группой является, например, малеимид, йодацетамид, пиридилдисульфид или другой реагирующий с тиолом партнер по конъюгированию (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). Реагентом, реагирующим с тиолом, может быть молекула лекарственного средства, флуорофор, такой как флуоресцентный краситель, подобный флуоресцеину или родамину, хелатообразующий агент для визуализации или радиоактивный металл, применяемый в терапии, пептидильная или непептидильная метка, или детектируемая метка, либо агент, модифицирующий клиренс, такой как различные изомеры полиэтиленгликоля, пептид, связывающийся с третьим компонентом, или другой углевод или липофильный агент.

d. Применение сконструированных на основе цистеина анти-CD79b антител

Сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела и их конъюгаты могут быть использованы в качестве терапевтических и/или диагностических средств. Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения, лечения, терапии или ослабления одного или нескольких симптомов, ассоциированных с В-клеточно-

опосредуемым расстройством. В частности, настоящее изобретение также относится к способам предупреждения, лечения, терапии или ослабления одного или нескольких симптомов, ассоциированных с клеточно-пролиферативным расстройством, таким как рак, например, лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная НХЛ, рецидивирующая агрессивная НХЛ, рецидивирующая бессимптомная НХЛ, не поддающаяся лечению НХЛ, не поддающаяся лечению бессимптомная НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома клеток коры головного мозга. Настоящее изобретение также относится к способам диагностики CD79b-опосредуемого расстройства или предрасположенности к развитию такого расстройства, а также к способам идентификации антител и антигенсвязывающих фрагментов антител, которые преимущественно связываются с В-клеточно-ассоциированными полипептидами CD79b.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к применению сконструированного на основе цистеина анти-CD79b антитела в целях приготовления лекарственного средства для лечения состояния, которое является восприимчивым к В-клеточно-опосредуемому расстройству.

е. Конъюгаты «сконструированное на основе цистеина антитело-лекарственное средство» (конъюгаты «тио-антитело-лекарственное средство» (TDC))

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к соединению-конъюгату «антитело-лекарственное средство», содержащему сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело (Ab), и молекулу ауристатинного лекарственного средства (D), где указанное сконструированное на основе цистеина антитело связано с D линкерной молекулой (L) посредством одной или нескольких свободных цистеиновых аминокислот, где указанное соединение имеет формулу I:



где p равно 1, 2, 3 или 4; и где сконструированное на основе цистеина антитело получают способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского анти-CD79b антитела одной или несколькими свободными цистеиновыми аминокислотами.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей смесь соединений «антитело-лекарственное средство» формулы I, где средняя загрузка лекарственного средства на антитело составляет примерно от 2 до 5 или примерно от 3 до 4.

На фигурах 24-28 и 48-49 представлены варианты конъюгатов «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» (ADC), где молекула ауристатинного лекарственного средства присоединена к введенной цистеиновой группе в легкой цепи (LC-ADC) или в тяжелой цепи (HC-ADC).

Возможными преимуществами конъюгатов «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» являются повышенная безопасность (более высокий терапевтический индекс); улучшенные фармакокинетические параметры; сохранение межцепевых дисульфидных связей антитела, которые могут стабилизировать конъюгат и поддерживать его конформацию, способствующую активному связыванию; возможность идентификации сайтов конъюгирования лекарственного средства; и возможность получения конъюгатов «сконструированное на основе цистеина антитело-лекарственное средство» в результате реакции конъюгирования сконструированных на основе цистеина антител с реагентами

«лекарственное средство-линкер», которая приводит к образованию более гомогенного продукта.

Линкеры

«Линкер», «линкерный компонент» или «связь» означает химическую группу, содержащую ковалентную связь или цепь атомов, которые ковалентно связывают антитело с молекулой лекарственного средства. В различных вариантах изобретения линкер обозначен L. «Линкер» (L) представляет собой бифункциональную или мультифункциональную молекулу, которая может быть использована для связывания одной или нескольких молекул лекарственного средства (D) и молекулы антитела (Ab) с образованием конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (ADC) формулы I. Конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (ADC) обычно получают с использованием линкера, имеющего реакционноспособную функциональную группу для связывания с лекарственным средством и с антителом. Тиол цистеина, введенного в антитело (Ab), может образовывать связь с электрофильной функциональной группой линкерного реагента, молекулы лекарственного средства или промежуточного соединения «лекарственное средство-линкер».

В одном из аспектов изобретения линкер имеет реакционноспособный сайт, содержащий электрофильную группу, реагирующую с нуклеофильным цистеином, присутствующим на антителе. Тиол цистеина указанного антитела реагирует с электрофильной группой на линкере и образует ковалентную связь с этим линкером. Подходящими электрофильными группами являются, но не ограничиваются ими, малеимидные и галогенацетамидные группы.

Линкерами являются двухвалентный радикал, такой как алкилдиил, арилен, гетероарил, молекулы, такие как: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, повторяющиеся звенья арилокси (например, полиэтиленокси, ПЭГ, полиметилениокси) и алкиламино (например, полиэтиленамино, Jeffamine™); и сложный эфир двухосновной кислоты, а также амиды, включая сукцинат, сукцинамид, дигликолят, малонат и капроамид.

Сконструированные на основе цистеина антитела подвергают реакции взаимодействия с линкерными реагентами или с промежуточными соединениями «лекарственное средство-линкер», электрофильными функциональными группами, такими как малеимид или α -галогенкарбонил, в соответствии с методами конъюгирования, описанными на странице 766 публикации Klusman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, и в соответствии с протоколом, описанным в примере 6.

Линкер может состоять из одного или более линкерных компонентов. Репрезентативными линкерными компонентами являются 6-малеимидокапроил («MC»), малеимидопропаноил («MP»), валин-цитруллин («val-cit» или «vc»), аланин-фенилаланин («ala-phe» или «af»), п-аминобензилоксикарбонил («PAB»), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат («SPP»), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC»), N-сукцинимидил-(4-йодацетил)аминобензоат («SIAB»), этиленокси- CH_2CH_2O- в качестве одного или нескольких повторяющихся элементов («EO» или «PEO»). Специалистам известны и другие линкерные компоненты, некоторые из которых описаны в настоящей заявке.

В одном из вариантов изобретения линкер L в ADC имеет формулу:



где:

A представляет собой удлиняющий компонент, ковалентно связанный с тиолом цистеина антитела (Ab);

а равно 0 или 1;

каждый -W- независимо представляет собой аминокислоту,

w независимо представляет собой целое число от 0 до 12,

Y означает спейсерный компонент, ковалентно связанный с молекулой

5 лекарственного средства; и

у равно 0, 1 или 2.

Удлиняющий компонент

Удлиняющий компонент (-A-), если он присутствует, способен связывать антитело с аминокислотой (-W-). В этом случае антитело (Ab) имеет функциональную группу, 10 которая может образовывать связь с функциональной группой удлиняющего компонента. Подходящими функциональными группами, которые могут присутствовать на антителе и которые могут быть либо природными, либо химически синтезированными, являются, но не ограничиваются ими, сульфгидрил (-SH), amino, гидроксил, карбокси, аномерная гидроксильная группа углевода и карбоксил. В одном 15 аспекте изобретения функциональными группами антитела являются сульфгидрил или amino. Сульфгидрильные группы могут образовываться путем восстановления внутримолекулярной дисульфидной связи антитела. Альтернативно сульфгидрильные группы могут образовываться посредством взаимодействия аминогруппы лизинового молекулы антитела в присутствии 2-иминотиолана (реагента Траута) или другого 20 сульфгидрил-образующего реагента. В одном из вариантов изобретения антитело (Ab) имеет свободную тиоловую группу цистеина, которая может образовывать связь с электрофильной функциональной группой удлиняющего компонента. Репрезентативные удлиняющие компоненты в конъюгатах формулы I представлены формулами II и III, где Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y определены выше, а R¹⁷ представляет собой двухвалентный 25 радикал, выбранный из (CH₂)_r, C₃-C₈карбоциклила, -O-(CH₂)_r, арилена, (CH₂)_r-арилена, арилен-(CH₂)_r, (CH₂)_r-(C₃-C₈-карбоциклила), -(C₃-C₈-карбоциклил)-(CH₂)_r, C₃-C₈-гетероциклила, (CH₂)_r-(C₃-C₈-гетероциклила), (C₃-C₈-гетероциклил)-(CH₂)_r, -(CH₂)_rC 30 (O)NR^b(CH₂)_r, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, (CH₂)C(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r, (CH₂)_rC (O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b (CH₂CH₂O)_r-CH₂- и -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r, где R^b представляет собой H, C₁-C₆ алкил, фенил или бензил, а r независимо представляет собой целое число 1-10.

35 Ариленами являются двухвалентные ароматические углеводородные радикалы с 6-20 атомами углерода, полученные путем удаления двух атомов водорода из исходной ароматической циклической системы. Типичными ариленовыми группами являются, но не ограничиваются ими, радикалы, происходящие от бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила и т.п.

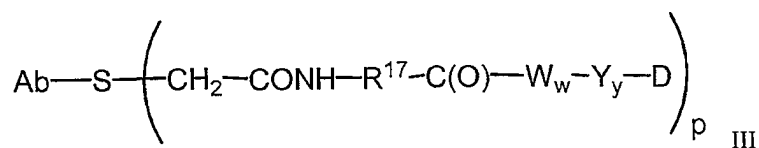
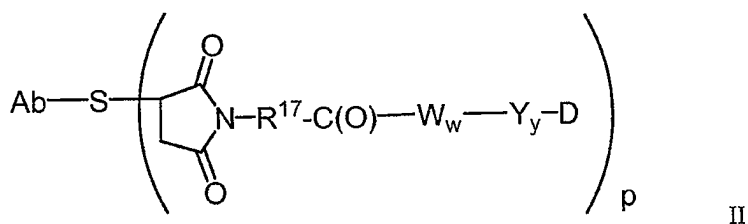
40 Гетероциклические группы включают кольцевую систему, в которой один или несколько атомов на кольце представляют собой гетероатом, например, атом азота, кислорода и серы. Гетероциклический радикал включает 1-20 атомов углерода и 1-3 гетероатома, выбранных из N, O, P и S. Гетероцикл может представлять собой моноцикл, имеющий 3-7 атомов на кольце (2-6 атомов углерода и 1-3 гетероатома, выбранных из 45 N, O, P и S), или бицикл, имеющий 7-10 атомов на кольце (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатома, выбранных из N, O, P и S), например, бицикло-[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- или -[6,6]-систему. Гетероциклы описаны в публикациях Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, в главах 1, 3, 4, 6, 7, и 9; в публикации "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs"

(John Wiley & Sons, New York, 1950, с исправлениями), в частности, в томах 13, 14, 16, 19 и 28; и в публикации J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Примерами гетероциклов являются, например, но не ограничиваются ими, пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, тетрагидротиофенил, окисленный серой тетрагидротиофенил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталенил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азоцинил, триазилил, 6Н-1,2,5-тиадиазилил, 2Н,6Н-1,5,2-дитиазилил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хроменил, ксантенил, феноксантилил, 2Н-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3Н-индолил, 1Н-индазолил, пуринил, 4Н-хинолизинил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4Аh-карбазолил, карбазолил, β-карболинил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиперазинил, индолинил, изоиндолинил, хинуклидинил, морфолинил, оксазолидинил, бензотриазолил, бензизоксазолил, оксиндолил, бензоксазолинил и изатиноил.

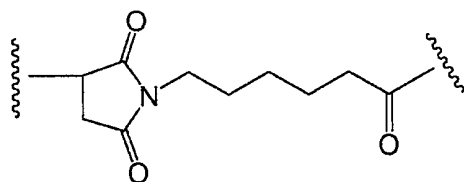
Карбоциклические группы включают насыщенное или ненасыщенное кольцо, имеющее от 3 до 7 атомов углерода в качестве моноцикла, или от 7 до 12 атомов углерода в качестве бицикла. Моноциклические карбоциклы имеют от 3 до 6 атомов на кольце, а обычно 5 или 6 атомов на кольце. Бициклические карбоциклы имеют от 7 до 12 атомов на кольце, например, расположенных в виде бицикло-[4,5]-, [5,5]-, [5,6]- или [6,6]-системы, или 9 или 10 атомов на кольце, расположенных в виде бицикло-[5,6]- или [6,6]- системы. Примерами моноциклических карбоциклов являются циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогептил и циклооктил.

Следует отметить, что во всех репрезентативных вариантах ADC формулы I, таких как соединения II-VI, даже если они не указаны конкретно, от 1 до 4 молекул лекарственного средства связаны с антителом (p=1-4), в зависимости от числа введенных цистеиновых остатков.



Репрезентативным удлиняющим компонентом является компонент формулы II, происходящий от малеимида-капроила (MC), где R¹⁷ представляет собой -(CH₂)₅-:

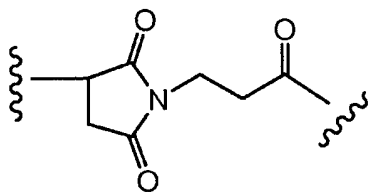
5



MC

Репрезентативным удлиняющим компонентом является компонент формулы II, происходящий от малеимида-пропаноила (MP), где R^{17} представляет собой $-(CH_2)_2-$:

10

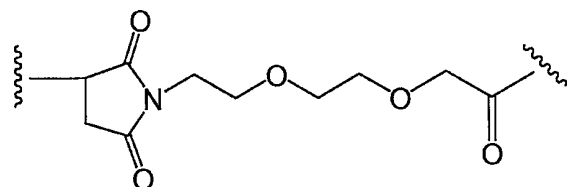


MP

15

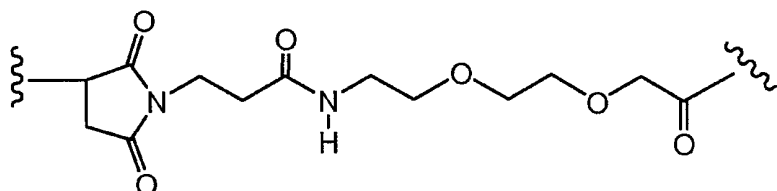
Другим репрезентативным удлиняющим компонентом является компонент формулы II, где R^{17} представляет собой $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, а r равно 2:

20



Другим репрезентативным удлиняющим компонентом является компонент формулы II, где R^{17} представляет собой $(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, где R^b представляет собой H, а каждый из r равен 2:

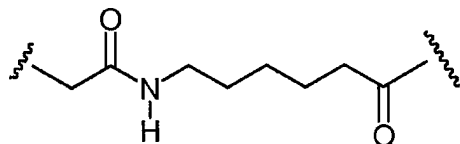
30



MPEG

35

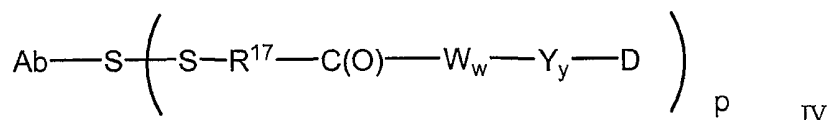
Другим репрезентативным удлиняющим компонентом является компонент формулы III, где R^{17} представляет собой $-(CH_2)_5-$:



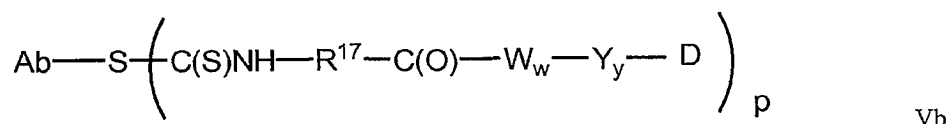
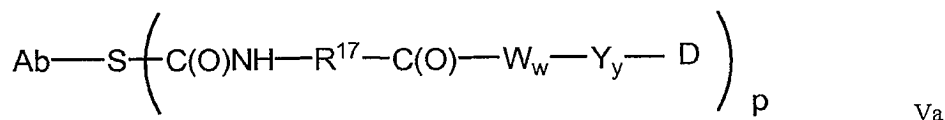
40

В другом варианте изобретения, указанный удлиняющий компонент связан со сконструированным на основе цистеина анти-CD79b антителом посредством дисульфидной связи, находящейся между атомом серы цистеина антитела и атомом серы удлиняющего компонента. Репрезентативный удлиняющий компонент данного варианта изобретения показан в формуле IV, где R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y определены выше.

45



В еще одном варианте изобретения, реакционноспособная группа удлиняющего компонента содержит реагирующую с тиолом функциональную группу, которая может образовывать связь со свободным тиолом цистеина антитела. Примерами реагирующих с тиолом функциональных групп являются, но не ограничиваются ими, малеимид, α-галогенацетил, активированные сложные эфиры, такие как сукцинимидоэфиры, 4-нитрофениловые эфиры, пентафторфениловые эфиры, тетрафторфениловые эфиры, ангидриды, хлорангидриды, сульфонилхлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. Репрезентативные удлиняющие компоненты данного варианта изобретения показаны в формулах Va и Vb, где R¹⁷, Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y определены выше.

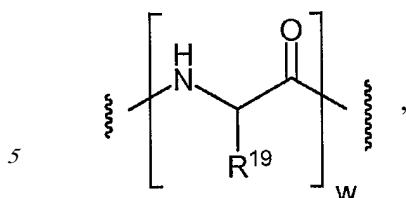


В другом варианте изобретения, указанным линкером может быть линкер дендритного типа для ковалентного связывания более чем одной молекулы лекарственного средства с антителом посредством ветвящейся многофункциональной линкерной молекулы (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Дендритные линкеры могут повышать молярное отношение лекарственного средства к антителу, т.е. при загрузке, которая соответствует эффективности ADC. Таким образом, если сконструированное на основе цистеина антитело имеет только одну реакционноспособную тиоловую группу цистеина, то множество молекул лекарственного средства могут быть ковалентно связаны посредством дендритного линкера.

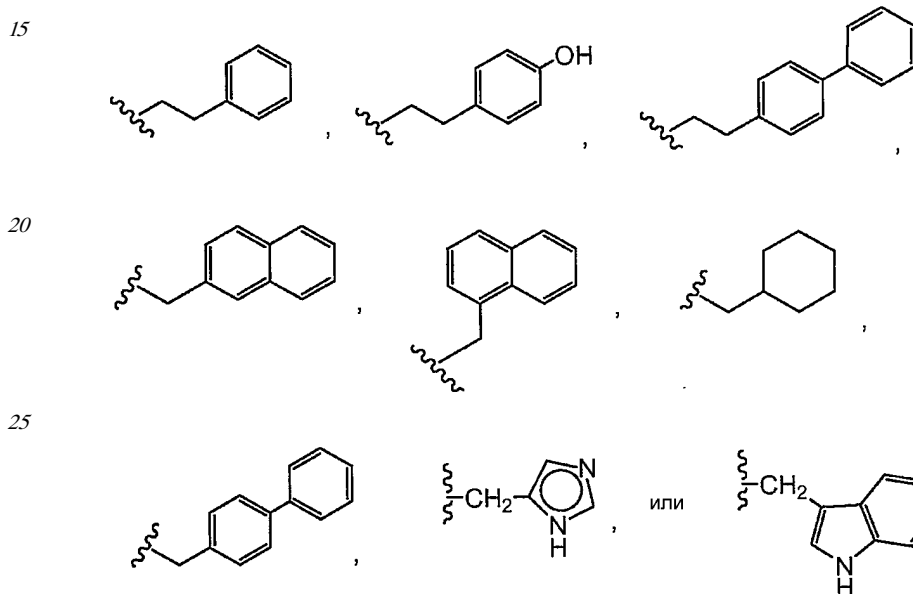
Аминокислотный компонент

Линкер может содержать аминокислотные остатки. Аминокислотный компонент (-W_w-), если он присутствует, связывает антитело (Ab) с молекулой лекарственного средства (D) сконструированного на основе цистеина конъюгата «антитело-лекарственное средство» (ADC) согласно изобретению.

-W_w- представляет собой дипептидный, трипептидный, тетрапептидный, пентапептидный, гексапептидный, гептапептидный, октапептидный, нонапептидный, декапептидный, ундекапептидный или додекапептидный компонент. Аминокислотными остатками, составляющими указанный аминокислотный компонент, являются природные остатки, а также небольшие аминокислоты, и неприродные аминокислотные аналоги, такие как цитруллин. Каждый из компонентов -W- независимо имеет формулу, представленную ниже в квадратных скобках, а w означает целое число от 0 до 12:



где R^{19} представляет собой водород, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, бензил, п-гидроксibenзил, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, CH_2COOH ,
 10 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$,
 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$,
 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-пиридилметил, 3-
 пиридилметил, 4-пиридилметил, фенил, циклогексил,



Если R^{19} не является водородом, то атом углерода, к которому присоединен R^{19} , является хиральным. Каждый атом углерода, к которому присоединен R^{19} , независимо присутствует в (S)- или (R)-конфигурации или в виде рацемической смеси. Таким образом, аминокислотные компоненты могут быть энантиомерно чистыми, рацемическими или
 35 диастереомерными.

Примерами аминокислотных компонентов $-W_w-$ являются дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примерами дипептидов являются валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Примерами трипептидов являются глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).
 40 Аминокислотными остатками, составляющими линкерный компонент, являются природные аминокислотные остатки, а также небольшие аминокислоты, и не природные аминокислотные аналоги, такие как цитруллин.

Аминокислотный компонент может быть ферментативно расщеплен одним или несколькими ферментами, включая опухолеассоциированную протеазу, с
 45 высвобождением молекулы лекарственного средства (D), которая, в одном из вариантов изобретения, после высвобождения подвергается протонированию in vivo с образованием лекарственного средства (D). Аминокислотные линкерные компоненты могут быть сконструированы и оптимизированы по их селективности к ферментативному

расщеплению конкретными ферментами, такими как, например, опухолеассоциированная протеаза, катепсин В, С и D, или плазминовая протеаза.

Спейсерный компонент

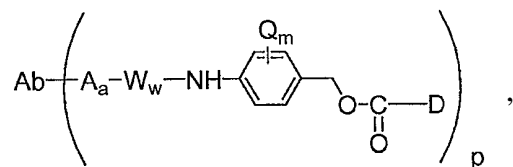
Спейсерный компонент (-Y-), если он присутствует (y=1 или 2), связывает
 5 аминокислотный компонент (-W_w-) с молекулой лекарственного средства (D), если такой аминокислотный компонент присутствует (w=1-12). Альтернативно, если такой аминокислотный компонент отсутствует, то указанный спейсерный компонент связывает удлиняющий компонент с молекулой лекарственного средства. Если отсутствуют
 10 аминокислотный компонент и удлиняющий компонент (w, y=0), то указанный спейсерный компонент также связывает молекулу лекарственного средства с молекулой антитела. Спейсерными компонентами являются компоненты двух общих типов: самоэлиминирующиеся и несамоэлиминирующиеся. Несамоэлиминирующийся спейсерный компонент представляет собой компонент, где часть спейсерного компонента или весь этот компонент остаются связанными с молекулой лекарственного
 15 средства после отщепления, а в частности, ферментативного отщепления аминокислотного компонента от конъюгата “антитело-лекарственное средство” или от конъюгата “лекарственное средство-линкер”. Если ADC, содержащий глицин-глициновый спейсерный компонент или глициновый спейсерный компонент, подвергаются ферментативному расщеплению протеазой, ассоциированной с
 20 опухолевыми клетками, протеазой, ассоциированной с раковыми клетками, или протеазой, ассоциированной с лимфоцитами, то молекула «глицин-глицин-лекарственное средство» или молекула «глицин-лекарственное средство» отщепляется от Ab-A_a-W_w. В одном из вариантов изобретения независимая реакция гидролиза происходит в клетках-мишенях и приводит к расщеплению связи в молекуле глицин-лекарственное средство
 25 с высвобождением лекарственного средства.

В другом варианте изобретения -Y_y- представляет собой p-аминобензилкарбамоилловый компонент (PAB), фениленовая часть которого замещена Q_m, где Q представляет собой C₁-C₈алкил, -O-(C₁-C₈алкил), галоген, нитро или циано,
 30 а m равно целому числу от 0 до 4.

Репрезентативными вариантами несамоэлиминирующихся спейсерных компонентов (-Y-) являются -Gly-Gly-; -Gly-; -Ala-Phe-; -Val-Cit-.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к конъюгату “лекарственное средство-линкер” или ADC, в которых отсутствует спейсерный
 35 компонент (y=0), или к их фармацевтически приемлемой соли или сольвату.

Альтернативно ADC, содержащий самоэлиминирующийся спейсерный компонент, может высвобождать молекулу D. В одном из вариантов изобретения -Y- представляет собой группу PAB, которая связана с -W_w- посредством атома азота аминогруппы PAB, и непосредственно связана с молекулой -D через карбонатную, карбаматную или
 40 эфирную группу, где ADC имеет нижеследующую репрезентативную структуру:



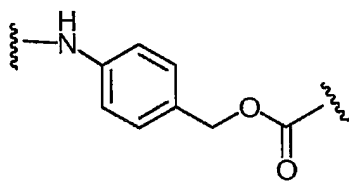
где Q представляет собой C₁-C₈алкил, -O-(C₁-C₈алкил), -галоген, -нитро или -циано; m равно целому числу от 0 до 4; а p равно 1-4.

Другими примерами самоэлиминирующихся спейсеров являются, но не

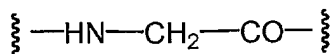
ограничиваются ими, ароматические соединения, которые по своим электронным свойствам аналогичны группе PAB, такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), гетероциклические аналоги PAB (US 2005/0256030), бета-глюкуронид (WO 2007/011968) и орто- или пара-аминобензилацетали.

Могут быть использованы спейсеры, которые подвергаются циклизации после гидролиза амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2:223), соответствующим образом замещенные кольцевые бицикло[2.2.1]- и бицикло[2.2.2]-системы (Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Примерами самоэлиминирующихся спейсеров, используемых в ADC, являются амин-содержащие лекарственные средства, замещенные в положении глицина (Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27:1447).

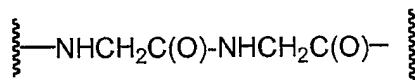
Репрезентативные спейсерные компоненты (-Y_y-) представлены формулами X-XII:



X



XI

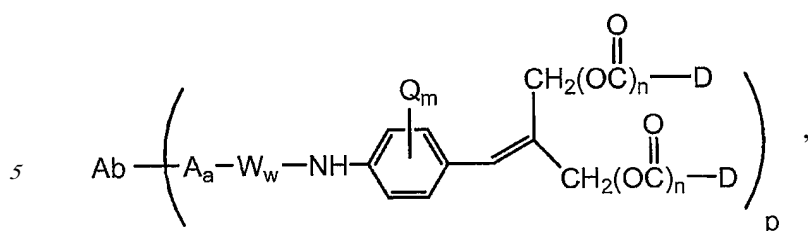


XII

Дендритные линкеры

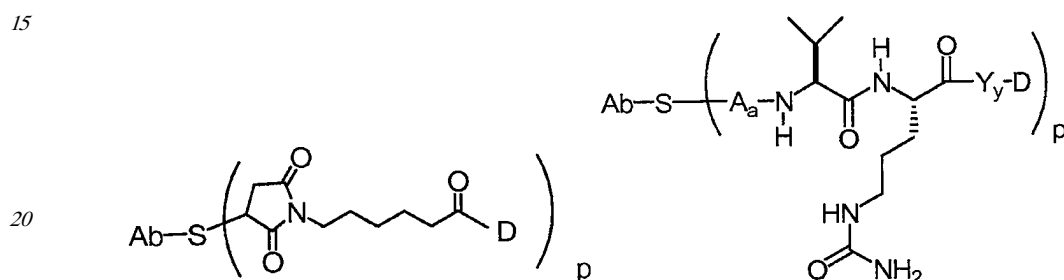
В другом варианте изобретения линкером L может быть линкер дендритного типа, используемый для ковалентного связывания более чем одной молекулы лекарственного средства с антителом посредством ветвящейся многофункциональной линкерной молекулы (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Дендритные линкеры могут повышать молярное отношение лекарственного средства к антителу, то есть, нагрузку, которая соответствует эффективности ADC. Таким образом, если сконструированное на основе цистеина антитело содержит только одну реакционноспособную тиоловую группу цистеина, то посредством дендритного линкера может быть присоединено большое количество молекул лекарственного средства. Репрезентативными вариантами разветвленных дендритных линкеров являются дендримерные компоненты, такие как 2,6-бис(гидроксиметил)-п-крезол и 2,4,6-трис(гидроксиметил)-фенол (WO 2004/01993; Szalai et al. (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689; Shamis et al. (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731; Amir et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499).

В одном из вариантов изобретения спейсерным компонентом является разветвленный бис(гидроксиметил)стирол (BHMS), который может быть использован для введения и высвобождения множества лекарственных средств и имеет структуру:



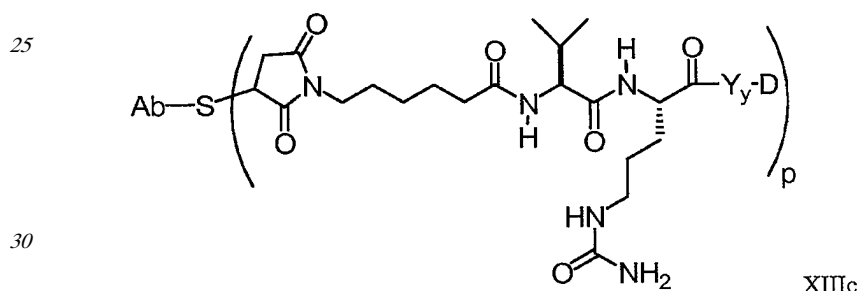
содержащую 2-(4-аминобензилиден)пропан-1,3-диоловый дендримерный компонент (WO 2004/043493; de Groot et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), где Q
10 представляет собой C₁-C₈алкил, O-(C₁-C₈алкил), -галоген, -нитро или -циано; m равно
целому числу от 0 до 4, n равно 0 или 1; a p равно 1-4.

Репрезентативными вариантами соединений-конъюгатов “антитело-лекарственное
средство” формулы I являются соединения XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit)
и XIIId (MC-val-cit-PAB):

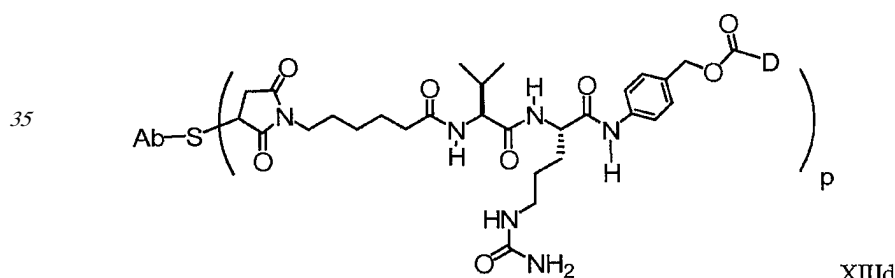


XIIIa

XIIIb

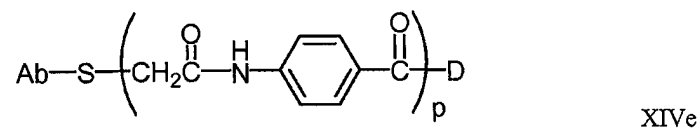
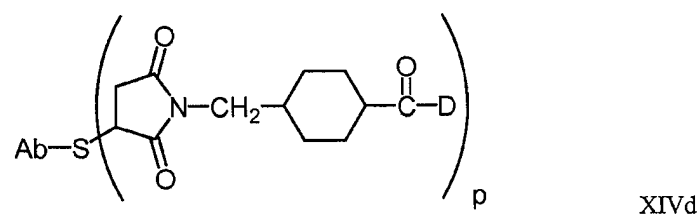
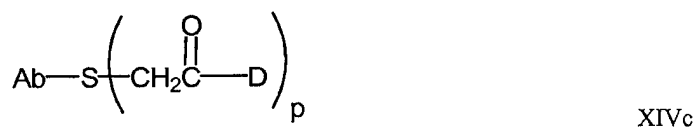
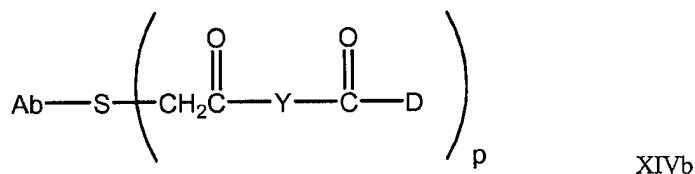
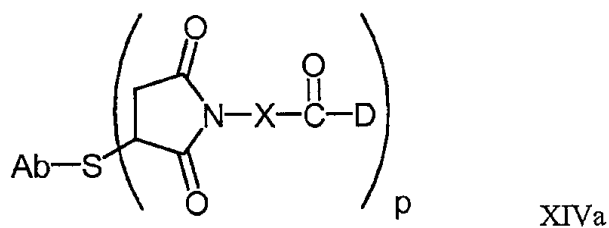


XIIIc

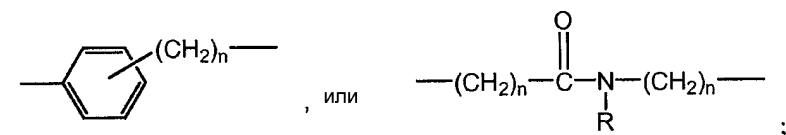
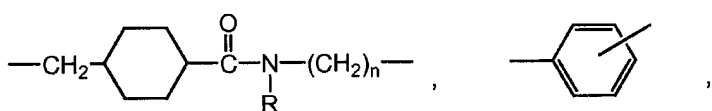
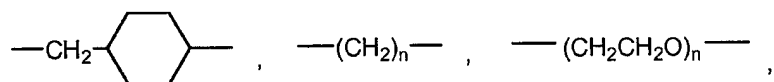


XIIIId

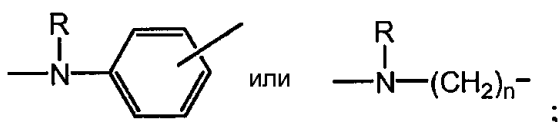
Другими репрезентативными вариантами соединений-конъюгатов “антитело-
лекарственное средство” формулы Ia являются соединения XIVa-e:



где X представляет собой:



40 Y представляет собой:



45 а R независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил, и n равно 1-12.

В другом варианте изобретения линкер имеет реакционноспособную функциональную группу, которая содержит нуклеофильную группу, реагирующую с электрофильной

группой, присутствующей на антителе. Подходящими электрофильными группами, присутствующими на антителе, являются, но не ограничиваются ими, карбонильные группы альдегида и кетона. Гетероатом нуклеофильной группы линкера может реагировать с электрофильной группой на антителе и образовывать ковалентную связь с молекулой антитела. Подходящими нуклеофильными группами на линкере являются, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, amino, гидразин, тиосемикарбазон, карбоксилат гидразина и арилгидразид. Электрофильная группа на антителе обеспечивает подходящий сайт для присоединения к линкеру.

Обычно пептидоподобные линкеры могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть образованы, например, методом синтеза в растворе (E. Schroder & K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press), хорошо известным специалистам в области пептидной химии. Линкерные промежуточные соединения могут быть получены с помощью любых комбинаций или последовательностей реакций, в которых участвуют спейсерные, удлиняющие и аминокислотные компоненты. Такие спейсерные, удлиняющие и аминокислотные компоненты могут содержать реакционноспособные функциональные группы, которые, по своей природе, являются электрофильными, нуклеофильными или свободно-радикальными. Реакционноспособными функциональными группами являются, но не ограничиваются ими, карбоксилы, гидроксилы, пара-нитрофенилкарбонат, изотиоцианат, и уходящие группы, такие как О-мезил, О-тозил, -Cl, -Br, -I или малеимид.

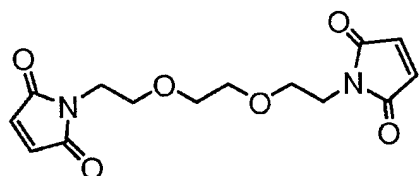
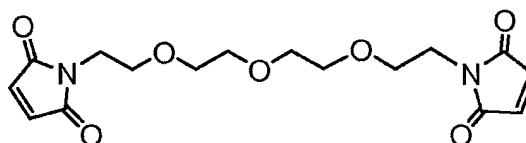
Так, например, заряженный заместитель, такой как сульфонат ($-\text{SO}_3^-$) или аммоний, может повышать растворимость реагентов в воде и облегчать реакцию взаимодействия линкерного реагента с антителом или с лекарственным средством, либо облегчать реакцию взаимодействия Ab-L (промежуточного соединения "антитело-линкер") с молекулой D, либо D-L (промежуточного соединения "лекарственное средство-линкер") с Ab, в зависимости от способа синтеза, применяемого для получения ADC.

Линкерные реагенты

Конъюгаты антитела и ауристатиона могут быть получены с использованием различных бифункциональных линкерных реагентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

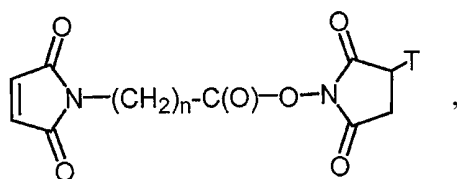
Конъюгаты «антитело-лекарственное средство» могут быть также получены с использованием линкерных реагентов: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоата), и с использованием бис-малеимидных реагентов: DTME, BMB, BMDV, BMH, BMOE, 1,8-бис-малеимидодиэтиленгликоля ($\text{BM}(\text{PEO})_2$), и 1,11-бис-малеимидотриэтиленгликоля ($\text{BM}(\text{PEO})_3$), которые являются коммерчески доступными и поставляются компанией Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, и другими поставщиками реагентов. Бис-малеимидные реагенты позволяют

последовательно или одновременно присоединять тиоловую группу цистеинового антитела к тиол-содержащей молекуле лекарственного средства, к метке или к линкерному промежуточному соединению. Помимо малеимида, другими функциональными группами, которые реагируют с тиоловой группой цистеинового антитела, молекулой лекарственного средства, меткой или промежуточным линкерным соединением, являются йодацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат.

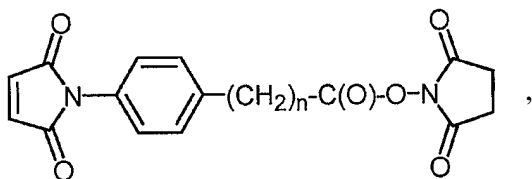
BM(PEO)₂BM(PEO)₃

Подходящие линкерные реагенты могут быть также получены из других коммерческих источников, таких как Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), либо они могут быть синтезированы в соответствии с процедурами, описанными 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; в патенте США 6214345; в WO 02/088172; патентных заявках США 2003130189 и 2003096743; в WO 03/026577; WO 03/043583 и WO 04/032828.

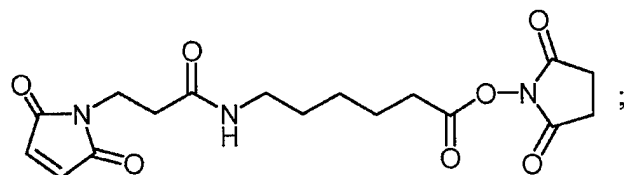
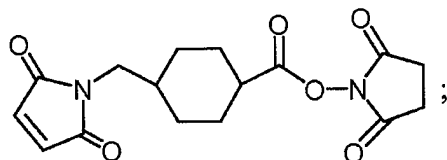
Удлиняющие компоненты формулы (IIIa) могут быть введены в линкер посредством реакции взаимодействия нижеследующих линкерных реагентов с N-концом аминокислотного компонента:

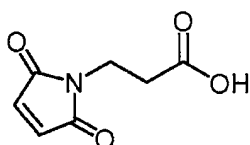
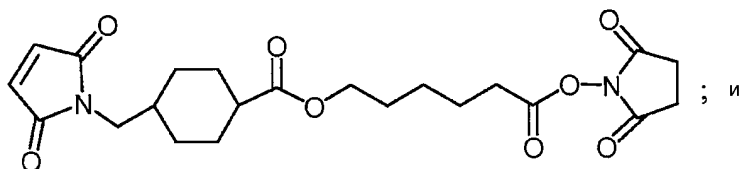


где n равно целому числу от 1 до 10, а T представляет собой -H или -SO₃Na;

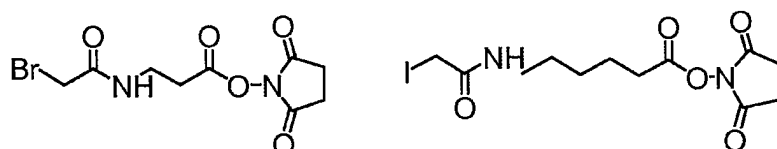
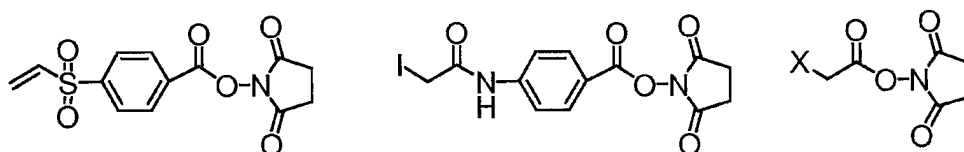


где n равно целому числу от 0 до 3;



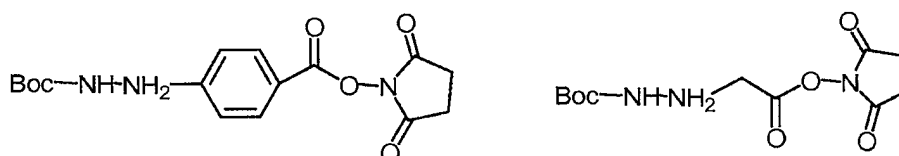
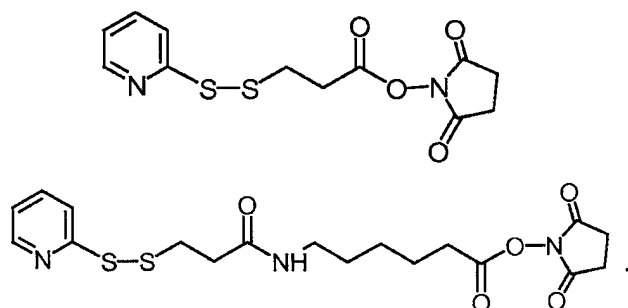


Удлиняющие компоненты могут быть введены в линкер посредством реакции взаимодействия нижеследующих бифункциональных реагентов с N-концом аминокислотного компонента:

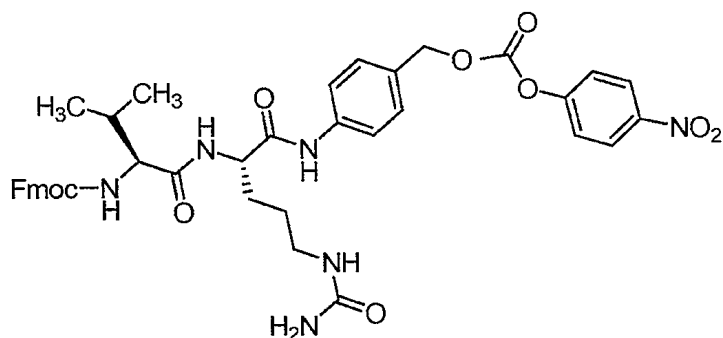


где X представляет собой Br или I.

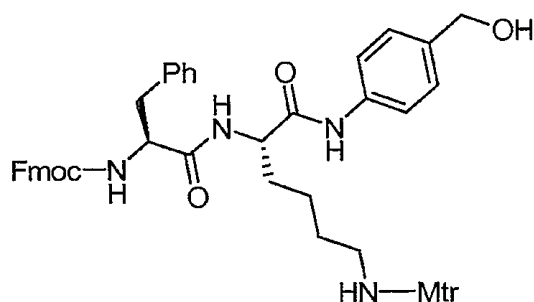
Удлиняющие компоненты указанной формулы могут быть также введены в линкер посредством реакции взаимодействия нижеследующих бифункциональных реагентов с N-концом аминокислотного компонента:



Репрезентативный дипептидный линкерный реагент валин-цитруллин (val-cit или vc), включающий малеимидный удлиняющий компонент и пара-аминобензилкарбамоильный (PAB) самоэлиминирующийся спейсер, имеет структуру:



Репрезентативный phe-lys(Mtr, моно-4-метокситритил)-дипептидный линкерный реагент, включающий малеимидный удлиняющий компонент и самоэлиминирующийся спейсерный компонент PAB, может быть получен как описано в работе Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, и имеет структуру:



Получение конъюгатов «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство»

ADC формулы I могут быть получены несколькими способами с применением реакций органического синтеза, условий и реагентов, известных специалистам, включая: (1) реакцию взаимодействия цистеиновой группы сконструированного на основе цистеина антитела с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения “антитело-линкер” Ab-L посредством ковалентной связи, с последующей реакцией взаимодействия с активированной молекулой лекарственного средства D; и (2) реакцию взаимодействия нуклеофильной группы молекулы лекарственного средства с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения “лекарственное средство-линкер” D-L посредством ковалентной связи, с последующей реакцией взаимодействия с цистеиновой группой антитела, сконструированного на основе цистеина. В методах конъюгирования (1) и (2), для получения конъюгатов “антитело-лекарственное средство” формулы I могут быть использованы различные сконструированные на основе цистеина антитела, молекулы лекарственного средства и линкеры.

Тиоловые группы цистеина антитела являются нуклеофильными и обладают способностью взаимодействовать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных реагентах и на промежуточных соединениях “лекарственное средство-линкер”, включая (i) активные сложные эфиры, такие как NHS-эфиры, HOBT-эфиры, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегидные, кетоновые, карбоксильные и малеимидные группы; и (iv) дисульфиды, включая пиридилдисульфиды, образующиеся в результате сульфидного обмена. Нуклеофильными группами на молекуле лекарственного средства являются, но не ограничиваются ими, аминовые, тиоловые, гидроксильные, гидразидные, оксимные, гидразиновые, тиосемикарбазоновые, гидразинкарбоксилатные и арилгидразидные группы, способные реагировать с

электрофильными группами на линкерных частях и линкерных реагентах с образованием ковалентных связей.

Сконструированные на основе цистеина антитела, способные образовывать конъюгаты с линкерными реагентами, могут быть получены путем обработки восстановителем, таким как DTT (реагент Клиланда, дитиотреитол) или TCEP (гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol. 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), с последующим проведением повторной реакции окисления для образования межцепевых и внутрицепевых дисульфидных связей (пример 5). Так, например, полноразмерные, сконструированные на основе цистеина моноклональные антитела (тио-Mab), экспрессируемые в клетках CHO, подвергают реакции восстановления примерно с 50-кратным избытком TCEP в течение 3 часов при 37°C для восстановления дисульфидных связей в продуктах присоединения цистеина, которые могут образовываться между вновь введенными цистеиновыми остатками и цистеином, присутствующим в культуральной среде. Восстановленный тио-Mab разводят и загружают на колонку HiTrap S в 10 mM ацетата натрия, pH 5, и элюируют PBS, содержащим 0,3 M хлорид натрия. Дисульфидные связи между цистеиновыми остатками, присутствующими в родительском Mab, снова восстанавливают с использованием разведенного (200 nM) водного сульфата меди (CuSO₄) при комнатной температуре в течение ночи. Альтернативно, после восстановительного расщепления цистеиновых аддуктов, для повторного восстановления внутрицепевых дисульфидных групп сконструированного на основе цистеина антитела, может быть использован эффективный окислитель, такой как дегидроаскорбиновая кислота (DHAА). Могут быть также использованы и другие окислители, то есть окисляющие агенты, и условия окисления, известные специалистам. Эффективным также является окисление на воздухе. Такая стадия мягкого неполного повторного окисления с высокой степенью надежности способствует образованию внутрицепевых дисульфидов и сохранению тиоловых групп только что введенных цистеиновых остатков. Затем добавляют приблизительно 10-кратный избыток промежуточного соединения “лекарственное средство-линкер”, например, MC-vc-PAВ-MMAЕ, перемешивают и оставляют примерно на 1 час при комнатной температуре для осуществления конъюгирования с образованием конъюгата “анти-CD79b антитело-лекарственное средство”. Затем конъюгированную смесь подвергают гель-фильтрации, загружают на колонку HiTrap S и элюируют с этой колонки для удаления избытка промежуточного соединения “лекарственное средство-линкер” и других примесей.

На фигуре 23 проиллюстрирован общий способ получения сконструированного на основе цистеина антитела, экспрессируемого в клеточной культуре, для последующего конъюгирования. Если среда для культивирования клеток содержит цистеин, то между только что введенной цистеиновой аминокислотой и цистеином среды могут образовываться дисульфидные аддукты. Эти цистеиновые аддукты, обозначенные кружками для репрезентативного тио-Mab (слева) на фигуре 23, должны быть восстановлены с получением сконструированных на основе цистеина антител, которые могут быть использованы для последующей реакции конъюгирования. Цистеиновые аддукты, предположительно, вместе с различными межцепевыми дисульфидными связями, подвергают восстановительному расщеплению под действием восстановителей, таких как TCEP, с получением восстановленной формы антитела. Межцепевые дисульфидные связи между связанными цистеиновыми остатками снова образуются в условиях неполного окисления, таких как обработка сульфатом меди, DHAА или воздействие атмосферного кислорода. Вновь введенные, сконструированные и

несвязанные цистеиновые остатки становятся доступными для реакции с линкерными реагентами или промежуточными соединениями “лекарственное средство-линкер”, в результате чего образуются конъюгаты антител согласно изобретению. Тио-Mab, экспрессируемые в клеточных линиях млекопитающих, образуют внешний Cys-аддукт, конъюгированный с введенным Cys посредством образования -S-S-связи. Следовательно, очищенные тио-Mab должны быть подвергнуты восстановлению и окислению, как описано в примере 5, с получением реакционноспособных тио-Mab. Эти тио-Mab используют для получения конъюгата с малеимидом, содержащего цитотоксические лекарственные средства, флуорофоры и другие метки.

Иммунолипосомы

Описанные здесь анти-CD79b антитела могут быть также получены в виде иммунолипосом. «Липосома» представляет собой небольшую везикулу, состоящую из липидов различных типов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые могут быть использованы для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно расположены так, что они образуют бислоем, аналогичный липидному бислою в биологических мембранах. Липосомы, содержащие антитело, получают методами, известными специалистам, такими как методы, описанные в публикации Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); в патентах 4485045 и 4544545; и в заявке WO97/38731, опубликованной 23 октября 1997 г. Липосомы с увеличенным временем полужизни в кровотоке описаны в патенте США № 5013556.

Конкретно используемые липосомы, в состав которых входят такие липиды, как фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭ), могут быть получены методом выпаривания с обратной фазой. Липосомы подвергают экструзии через фильтры с определенным размером пор, в результате чего получают липосомы нужного диаметра. Fab'-фрагменты антитела согласно изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано в публикации Martin et al., *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982), в результате проведения реакции дисульфидного обмена. Липосома может содержать, но необязательно, химиотерапевтическое средство. См. Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

В. Некоторые методы получения антител

1. Скрининг на анти-CD79b антитела с нужными свойствами

Методы получения антител, связывающихся с полипептидами CD79b, описаны выше. При желании, могут быть также выбраны и другие антитела с определенными биологическими свойствами.

Рост-ингибирующее действие анти-CD79b антитела согласно изобретению может быть оценено методами, известными специалистам, например, с использованием клеток, которые экспрессируют полипептид CD79b либо эндогенно, либо после трансфекции геном CD79b. Так, например, соответствующие опухолевые клеточные линии и CD79b-трансфицированные клетки могут быть обработаны моноклональным анти-CD79b антителом согласно изобретению в различных концентрациях в течение нескольких дней (например, 2-7 дней), и окрашены кристаллическим фиолетовым или МТТ, либо проанализированы с помощью некоторых других колориметрических анализов. Другой метод измерения уровня пролиферации может представлять собой сравнение поглощения ³H-тимидина клетками, обработанными в присутствии или при отсутствии анти-CD79b антитела согласно изобретению. После обработки клетки собирают, и уровень радиоактивности, включенной в ДНК, подсчитывают в сцинтилляционном счетчике. Соответствующий позитивный контроль включает обработку выделенной клеточной

линии рост-ингибирующим антителом, которое, как известно, ингибирует рост такой клеточной линии. Ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo* может быть определено различными методами, известными специалистам. Опухолевой клеточной линией может быть клеточная линия, сверхэкспрессирующая полипептид CD79b. В одном из вариантов изобретения анти-CD79b антитело ингибирует пролиферацию CD79b-экспрессирующих опухолевых клеток *in vitro* или *in vivo* примерно на 25-100%, более предпочтительно примерно на 30-100%, а еще более предпочтительно примерно на 50-100% или 70-100% по сравнению с необработанными опухолевыми клетками при концентрации антитела примерно от 0,5 до 30 мкг/мл. Ингибирование роста может быть измерено при концентрации антитела примерно от 0,5 до 30 мкг/мл или примерно от 0,5 нМ до 200 нМ в клеточной культуре, где указанное ингибирование роста определяют через 1-10 дней после обработки опухолевых клеток антителом. Антитело обладает рост-ингибирующим действием *in vivo*, если введение анти-CD79b антитела в количестве примерно от 1 мкг/мл до 100 мг/кг массы тела приводит к уменьшению размера опухоли или к снижению уровня пролиферации опухолевых клеток за период времени примерно от 5 дней до 3 месяцев, а предпочтительно за период времени примерно от 5 до 30 дней после первого введения антитела.

Для отбора анти-CD79b антитела, которое индуцирует гибель клеток, может быть оценена потеря целостности мембраны, как было установлено, например, по поглощению йодида пропидия (PI), трипанового синего или 7AAD по сравнению с контролем. Анализ на поглощение PI может быть осуществлен при отсутствии комплемента и иммунных эффекторных клеток. Опухолевые клетки, экспрессирующие полипептид CD79b, инкубируют либо только со средой, либо со средой, содержащей соответствующее анти-CD79b антитело (например, примерно 10 мкг/мл). Клетки инкубируют в течение 3 дней. После каждой обработки клетки промывают и разделяют на аликвоты в пробирках (35 мм, 12×75) с плотно закрывающейся крышкой (1 мл на пробирку, 3 пробирки на каждую группу обработки) для удаления скоплений клеток. Затем в пробирки добавляют PI (10 мкг/мл). Образцы могут быть проанализированы на проточном цитометре FACSCAN® и с использованием компьютерной программы FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Анти-CD79b антитела, которые индуцируют статистически значимые уровни гибели клеток, как было определено по поглощению PI, могут быть отобраны как анти-CD79b антитела, индуцирующие гибель клеток.

Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом на полипептиде CD79b, связанном с представляющим интерес антителом, может быть проведен рутинный анализ на перекрестное блокирование, такой как анализ, описанный в руководстве *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Этот анализ может быть осуществлен для того, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же сайтом или эпитопом, с которыми связывается известное анти-CD79b антитело. Альтернативно или дополнительно может быть осуществлено картирование эпитопов известными методами. Так, например, последовательность антитела может быть подвергнута мутагенезу, такому как аланин-сканирующий мутагенез для идентификации контактирующих остатков. Мутантное антитело сначала тестируют на связывание с поликлональным антителом для гарантии «правильной» укладки. В другом методе пептиды, соответствующие различным областям полипептида CD79b, могут быть использованы в анализах на конкурентное связывание с тестируемыми антителами или с тестируемым антителом и с антителом, которое связывается с охарактеризованным или известным эпитопом.

2. Некоторые методы скрининга библиотек

Анти-CD79b антитела согласно изобретению могут быть получены с использованием комбинаторных библиотек для скрининга антител с нужной активностью или с нужными активностями. Так, например, специалистам известен ряд методов получения библиотек фагового представления и скрининга таких библиотек на антитела, обладающие желаемыми связывающими свойствами. Такие методы в основном описаны в публикации Hoogenboom et al. (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), а некоторые их варианты - в публикации Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

В принципе, клоны синтетических антител отбирают путем скрининга фаговых библиотек, содержащих фаг, который представляет различные фрагменты вариабельной области антитела (Fv), присоединенные к белку оболочки фага. Такие фаговые библиотеки подвергают пэннингу с помощью аффинной хроматографии против нужного антигена. Клоны, экспрессирующие Fv-фрагменты, способные связываться с нужным антигеном, подвергают адсорбции на антигене и, тем самым, их отделению от несвязывающихся клонов в библиотеке. Затем связывающиеся клоны элюируют с антигена, после чего число этих клонов может быть увеличено путем проведения дополнительных циклов адсорбции/элюирования антигена. Любое из анти-CD79b антител согласно изобретению может быть получено с применением подходящей процедуры скрининга антигена для отбора на представляющий интерес клон фага с последующим конструированием полноразмерного клона анти-CD79b антитела с использованием последовательностей Fv, происходящих от представляющего интерес клон фага, и подходящих последовательностей константной области (Fc), описанных Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

В некоторых вариантах изобретения антигенсвязывающий домен антитела образуется из двух вариабельных (V) областей, состоящих примерно из 110 аминокислот, одна из которых находится в легкой цепи (VL), а другая в тяжелой цепи (VH), и в этих вариабельных областях присутствуют три гипервариабельных петли (HVR) или комплементарность-определяющие области (CDR). Вариабельные домены могут быть функционально представлены на фаге либо как одноцепочечные Fv- (scFv)-фрагменты, в которых VH и VL ковалентно связаны друг с другом посредством короткого гибкого пептида, либо как Fab-фрагменты, в которых каждый из этих вариабельных доменов присоединен к константному домену и подвергается нековалентному взаимодействию, как описано Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Используемые здесь scFv-кодирующие фаговые клоны и Fab-кодирующие фаговые клоны, в целом, называются «фаговыми Fv-клонами» или «Fv-клонами».

Наборы генов VH и VL могут быть отдельно клонированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и подвергнуты неспецифической рекомбинации в фаговых библиотеках, а затем они могут быть проанализированы на антигенсвязывающие клоны, как описано в публикации Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Библиотеки от иммунизированных источников позволяют получить антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, и при этом не требуется проведения процедуры конструирования гибридом. Альтернативно может быть клонирован набор человеческих антител дикого типа с получением одного источника человеческих антител против неаутоантигенов, а также аутоантигенов широкого ряда, не прибегая, при этом, к какой-либо иммунизации, как описано Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). И наконец, исходные библиотеки могут быть также синтезированы путем клонирования

неаранжированных сегментов V-гена из стволовых клеток и с использованием ПЦР-праймеров, содержащих рандомизированную последовательность, кодирующую в высокой степени варьируемые CDR3-области, в целях достижения реаранжировки *in vitro*, как описано Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

5 В некоторых вариантах изобретения, для представления фрагментов антител путем их присоединения к минорному оболочечному белку рIII, используют нитчатый фаг. Фрагменты антител могут быть представлены в виде одноцепочечных Fv-фрагментов, в которых домены VH и VL присоединены на одной и той же полипептидной цепи посредством гибкого полипептидного спейсера, например, как описано Marks et al., J.
10 Mol. Biol., 222:581-597 (1991), или в виде Fab-фрагментов, в которых одна цепь присоединена к рIII, а другая секретируется в периплазму бактериальной клетки хозяина, где происходит сборка структуры оболочечного белка Fab, который отображается на поверхности фага посредством замены некоторых из оболочечных белков дикого типа, например, как описано в публикации Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19:4133-4137
15 (1991).

Обычно нуклеиновые кислоты, содержащие гены, кодирующие фрагменты антител, получают из иммунных клеток, взятых у человека или животных. Если необходимо получить библиотеку, состоящую преимущественно из клонов анти-CD79b антител, то индивидуума иммунизируют CD79b для вырабатывания у него гуморального ответа,
20 а затем, для конструирования библиотеки, выделяют клетки селезенки и/или циркулирующие В-клетки, не принадлежащие к популяции лимфоцитов периферической крови (ЛПК). В предпочтительном варианте изобретения библиотеку генов фрагментов человеческого антитела, содержащую преимущественно клоны анти-CD79b антитела, получают посредством вырабатывания ответа в виде продуцирования анти-CD79b
25 антител у трансгенных мышей, несущих массив функциональных генов человеческого иммуноглобулина (и не содержащих функциональной системы продуцирования эндогенного антитела), где такая CD79b-иммунизация будет приводить к образованию В-клеток, продуцирующих человеческие антитела против CD79b. Генерирование трансгенных мышей, продуцирующих человеческое антитело, описано ниже.

30 Дополнительное обогащение клеточной популяции реакционноспособными анти-CD79b антителами может быть достигнуто с помощью подходящей процедуры скрининга для выделения В-клеток, экспрессирующих CD79b-специфическое мембраносвязанное антитело, например, путем разделения клеток с помощью CD79b-аффинной хроматографии или адсорбции клеток на CD79b, меченном флуорохромом, и
35 последующего клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS).

Альтернативно использование клеток селезенки и/или В-клеток или других ЛПК, взятых от неиммунизированного донора, обеспечивает лучшее представление возможного репертуара антител, а также позволяет конструировать библиотеку антител у животных любого вида (у человека или у других животных), у которых CD79b не
40 является антигенным. Для создания библиотек, включающих конструцию генов антител *in vitro*, у индивидуума берут стволовые клетки и выделяют нуклеиновые кислоты, кодирующие неаранжированные сегменты генов антител. Представляющие интерес иммунные клетки могут быть выделены у животных различных видов, таких как человек, мыши, крысы, зайцеобразные, волки, собаки, кошки, свиньи, коровы, лошади, птицы
45 и т.п.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую сегменты генов варьируемых областей антитела (включая VH- и VL-сегменты), выделяют из представляющих интерес клеток и амплифицируют. В случае использования библиотек реаранжированных генов VH и

VL, нужная ДНК может быть получена путем выделения геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующим проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, соответствующих 5'- и 3'-концам реаранжированных генов VH и VL, описанных в публикации Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989), и тем самым получения различных наборов V-генов для экспрессии. V-гены могут быть амплифицированы из кДНК и геномной ДНК с использованием обратных праймеров у 5'-конца экзона, кодирующего зрелый V-домен, и прямых праймеров, полученных на основе J-сегмента, как описано в публикациях Orlandi et al. (1989) и Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Однако для амплификации из кДНК обратные праймеры могут быть также получены на основе лидерного экзона, как описано в публикации Jones et al., Biotechnol., 9:88-89 (1991), а прямые праймеры могут быть введены в константную область, как описано в публикации Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989). Для максимизации комплементарности могут быть получены вырожденные праймеры, описанные в публикации Orlandi et al. (1989) или Sastry et al. (1989). В некоторых вариантах изобретения разнообразие библиотек максимизируют с использованием ПЦР-праймеров, нацеленных на каждое семейство V-генов, в целях амплификации всех имеющихся аранжировок VH и VL, присутствующих в образце нуклеиновой кислоты иммунной клетки, например, методом, описанным в публикации Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), или методом, описанным в публикации Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в экспрессионные векторы, в ПЦР-праймер могут быть введены редкие рестрикционные сайты в качестве метки у одного конца, как описано Orlandi et al. (1989), либо такое введение может быть осуществлено с помощью ПЦР-амплификации с использованием меченого праймера, как описано Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

Наборы синтетически реаранжированных генов V могут быть получены *in vitro* из V-генных сегментов. Большинство сегментов человеческих генов VH были клонированы и секвенированы (как сообщалось в публикации Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992)), а затем картированы (как сообщалось в публикации Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993); и эти клонированные сегменты (включая все основные конформации петли H1 и H2) могут быть использованы для получения различных наборов генов VH с использованием ПЦР-праймеров, кодирующих петли H3, имеющие различные последовательности и различные длины, как описано в публикации Hoogenboom и Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Могут быть также получены наборы VH, имеющие все разнообразие последовательностей, сосредоточенное в длинной петле H3 одной длины, как описано в публикации Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). Были клонированы и секвенированы человеческие сегменты V κ и V λ (как сообщалось в публикации Williams & Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)), и такие сегменты могут быть использованы для получения синтетических наборов легких цепей. Наборы синтезированных генов V, полученных на основе складчатой структуры ряда VH и VL и L3 и H3 различной длины, будут кодировать антитела со значительно варьирующейся структурой. После амплификации кодирующей ДНК гена V, сегменты гена V зародышевой линии могут быть реаранжированы *in vitro* методами, описанными в публикации Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

Наборы фрагментов антител могут быть сконструированы путем объединения наборов генов VH и VL несколькими путями. Каждый набор может быть создан в различных векторах, и эти векторы подвергают рекомбинации *in vitro*, например, как

описано в публикации Hogrefe et al., *Gene*, 128:119-126 (1993), или *in vivo* путем комбинаторного инфицирования, например, системой loxP, описанной в публикации Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993). В методе рекомбинации *in vivo* используется двухцепочечная природа Fab-фрагментов для устранения ограничения, налагаемого на размер библиотеки и связанного с эффективностью трансформации *E. coli*. Исходные наборы VH и VL клонируют отдельно, один в фагмиду, а другой - в фаговый вектор. Затем две библиотеки объединяют путем инфицирования бактерии, содержащей фагмиду, фагом, так, чтобы каждая клетка содержала различные комбинации, а размер библиотеки был ограничен только числом присутствующих клеток (примерно 10^{12} клонов). Оба вектора содержат сигналы рекомбинации *in vivo*, в результате чего гены VH и VL подвергаются рекомбинации с образованием одного репликона и совместно упаковываются в фаговые вирионы. Эти огромные библиотеки представляют большое число различных антител с высокой аффинностью (K_d^{-1} примерно 10^8 М).

Альтернативно такие наборы могут быть последовательно клонированы в один и тот же вектор, например, как описано в публикации Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991), либо они могут быть собраны вместе с помощью ПЦР, а затем клонированы, например, как описано в публикации Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991). ПЦР-сборка может быть также осуществлена для присоединения ДНК VH и VL к ДНК, кодирующей гибкий пептидный спейсер, с образованием наборов одноцепочечных Fv (scFv). В еще одном методе «ПЦР-сборка в клетках» применяется для объединения генов VH и VL в лимфоцитах с помощью ПЦР с последующим клонированием наборов сцепленных генов, как описано в публикации Embleton et al., *Nucl. Acids Res.*, 20:3831-3837 (1992).

Антитела, продуцируемые исходными библиотеками (природными или синтетическими), могут иметь невысокую аффинность (K_d^{-1} примерно от 10^6 до 10^7 М⁻¹), однако созревание аффинности может быть также смоделировано *in vitro* путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек, как описано в публикации Winter et al. (1994), см. выше. Так, например, мутация может быть введена случайно *in vitro* с использованием полимеразной реакции с вероятностью ошибки (Leung et al., *Technique*, 1:11-15 (1989)) в методе, описанном Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992), или методе, описанном Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992). Кроме того, созревание аффинности может быть осуществлено посредством случайной мутации одной или нескольких CDR, например, с помощью ПЦР, проводимой с использованием праймеров, несущих рандомизированную последовательность, охватывающую представляющую интерес CDR в отдельно выбранных Fv-клонах, и с помощью скрининга клонов с более высокой аффинностью. В заявке WO 9607754 (опубликованной 14 марта 1996 г.) описан метод индуцирования мутагенеза в гипервариабельной области легкой цепи иммуноглобулина с получением библиотеки генов легкой цепи. Другим эффективным методом является рекомбинация доменов VH или VL, отобранных с помощью фагового представления, с наборами природных вариантов V-домена, выделенных у неиммунизированных доноров, и скрининг на более высокую аффинность, проводимый в несколько раундов перестановки цепей, как описано в публикации Marks et al., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992). Этот метод позволяет продуцировать антитела и фрагменты антител с аффинностями примерно 10^9 М или менее.

Скрининг библиотек может быть осуществлен различными методами, известными специалистам. Так, например, CD79b может быть использован для покрытия лунок адсорбционных планшетов, или экспрессирован на клетках-хозяевах, прикрепленных к адсорбционным планшетам, либо он может быть использован для клеточного сортинга, или конъюгирован с биотином для захвата на сферах, покрытых стрептавидином, либо он может быть использован в любом другом методе пэннинга библиотек фагового представления.

Образцы фаговых библиотек подвергают контактированию с иммобилизованным CD79b в условиях, подходящих для связывания по меньшей мере части фаговых частиц с адсорбентом. Обычно, для имитации физиологических условий, выбирают соответствующие рН, ионную силу, температуру и т.п. Фаги, связанные с твердой фазой, промывают, а затем элюируют кислотой, например, как описано в публикации Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88:7978-7982 (1991), или щелочью, например, как описано в публикации Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), или путем конкурентного связывания с антигеном CD79b, например, в соответствии с процедурой, аналогичной процедуре, осуществляемой в методе конкурентного связывания с антигеном, как описано в публикации Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Фаги могут быть подвергнуты 20-1000-кратному обогащению в одном раунде отбора. Кроме того, обогащенные фаги могут быть выращены в бактериальной культуре и подвергнуты дополнительным раундам отбора.

Эффективность отбора зависит от многих факторов, включая кинетику диссоциации во время промывки, и от способности множества фрагментов антитела одновременно связываться с антигеном на одном фаге. Антитела с быстрой кинетикой диссоциации (и слабой аффинностью связывания) могут быть фиксированы благодаря кратковременным промывкам, применению мультивалентного фагового представления и высокой плотности покрытия антигена на твердой фазе. Такая высокая плотность не только позволяет стабилизировать фаг благодаря мультивалентным взаимодействиям, но также благоприятствует повторному связыванию фага, который является диссоциированным. Отбор антител со слабой кинетикой диссоциации (и с высокой аффинностью связывания) может быть улучшен благодаря более длительным промывкам и применению моновалентного фагового представления, описанного в публикации Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990) и в WO 92/09690, а также благодаря низкой плотности покрытия антигена, как описано в публикации Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992).

Может быть проведен отбор между фаговыми антителами с различными аффинностями, даже с немного отличающейся аффинностью по отношению к CD79b. Однако случайная мутация выбранного антитела (например, внесенная при осуществлении некоторых из описанных выше методов созревания аффинности), вероятно, будет приводить к образованию множества мутантов, большинство из которых будут связываться с антигеном, а некоторые из них с еще большей аффинностью. При ограниченном уровне CD79b редкий фаг с высокой аффинностью может выдержать такую конкуренцию. Для сохранения всех мутантов с более высокой аффинностью, фаги могут быть инкубированы с избытком биотинилированного CD79b, но этот биотинилированный CD79b должен иметь более низкую молярную концентрацию, чем молярная константа аффинности мишени для CD79b. Затем фаги с высокой аффинностью связывания могут быть захвачены парамагнитными сферами, покрытыми стрептавидином. Такой «равновесный захват» дает возможность проводить отбор антител по их аффинности связывания с чувствительностью, которая позволяет

из большого избытка фагов с меньшей аффинностью выделить мутантные клоны, имеющие лишь в два раза более высокую аффинность. Условия, используемые для промывки фагов, связанных с твердой фазой, могут быть также изменены для выявления их отличий исходя из кинетики диссоциации.

5 Клоны анти-CD79b антител могут быть отобраны по их активности. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителам, которые связываются с живыми клетками, обычно экспрессирующими CD79b. В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к анти-CD79b антителам, которые блокируют связывание лиганда CD79b с CD79b, но не блокируют связывание лиганда
10 CD79b со вторым белком. Fv-клоны, соответствующие таким анти-CD79b антителам, могут быть отобраны путем: (1) выделения клонов анти-CD79b антител из фаговой библиотеки, как описано выше, и, но необязательно, амплификации выделенной популяции фаговых клонов путем культивирования такой популяции в подходящем бактериальном хозяине; (2) выбора CD79b и второго белка, против которого необходимо
15 продуцировать блокирующую и неблокирующую активность, соответственно; (3) адсорбции фаговых клонов анти-CD79b антител на иммобилизованном CD79b; (4) использования избытка второго белка для элюирования любых нежелательных клонов, распознающих CD79b-связывающиеся детерминанты, которые перекрываются со связывающими детерминантами второго белка или имеют общие с ним связывающие
20 детерминанты; и (5) элюирования клонов, которые остаются адсорбированными после проведения стадии (4). Клоны с нужными блокирующими/неблокирующими свойствами, могут быть также, но необязательно, обогащены путем проведения одной или нескольких повторных процедур отбора, описанных в настоящей заявке.

ДНК, кодирующая продуцируемые гибридомой моноклональные антитела или Fv-
25 клоны фагового представления согласно изобретению, могут быть легко выделены и секвенированы в соответствии со стандартными процедурами (например, с использованием олигонуклеотидных праймеров, которые способны специфически амплифицировать представляющие интерес кодирующие области тяжелой и легкой цепей из гибридомы или фаговой ДНК-матрицы). После выделения эта ДНК может
30 быть встроена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или миеломные клетки, которые в иных случаях не продуцируют белок иммуноглобулина, в результате чего в этих рекомбинантных клетках-хозяевах синтезируются нужные моноклональные антитела. Обсуждение рекомбинантной
35 экспрессии антитело-кодирующей ДНК в бактериях можно найти в обзорных статьях Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

ДНК, кодирующая Fv-клоны согласно изобретению, может быть объединена с известными последовательностями ДНК, кодирующими константные области тяжелой
40 цепи и/или легкой цепи (например, соответствующие последовательности ДНК могут быть получены, как описано в публикации Kabat et al., см. выше), с образованием клонов, кодирующих полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи или их фрагменты. Следует отметить, что в этих целях могут быть использованы константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и такие константные
45 области могут быть получены от человека или животных любых видов. В определение используемого здесь термина «химерное» и «гибридное» антитело входит Fv-клон, происходящий от ДНК варибельного домена животного одного вида (например, человека), который был затем присоединен к ДНК константной области животного

другого вида с образованием кодирующей(их) последовательности(ей) «гибрида» полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах изобретения Fv-клон, происходящий от ДНК человеческой вариабельной области, присоединяют к ДНК человеческой константной области с образованием кодирующей(их) последовательности(ей) для всех человеческих полноразмерных или неполноразмерных тяжелых и/или легких цепей.

ДНК, кодирующая анти-CD79b антитело, происходящее от гибридомы, может быть также модифицирована, например, путем замены гомологичных мышинных последовательностей, происходящих от гибридного клона, кодирующей последовательностью для человеческих константных доменов тяжелой и легкой цепи (например, как в способе, описанном Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующая антитело, происходящее от гибридомы или Fv-клона, или его фрагмент, может быть также модифицирована путем ковалентного связывания иммуноглобулин-кодирующей последовательности с полноразмерной последовательностью, кодирующей неиммуноглобулиновый полипептид, или с ее частью. Таким образом могут быть получены «химерные» или «гибридные» антитела, обладающие специфичностью связывания с антителами, происходящими от Fv-клона или гибридного клона согласно изобретению.

С. Антитело-зависимая опосредуемая ферментом пролекарственная терапия(ADEPT)

Антитела согласно изобретению могут быть также использованы в ADEPT в виде антитела, конъюгированного с пролекарство-активирующим ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидильное химиотерапевтическое средство, см. WO81/01145) в активное противораковое лекарственное средство. См., например, WO 88/07378 и патент США № 4975278.

Ферментный компонент иммуноконъюгата, подходящего для ADEPT, включает любой фермент, способный действовать на пролекарство, а именно, превращать такое пролекарство в более активную цитотоксическую форму.

Ферментами, которые могут быть использованы в способе согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, щелочные фосфатазы, которые могут быть использованы для превращения фосфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазы, которые могут быть использованы для превращения сульфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминаза, которая может быть использована для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противораковое лекарственное средство, а именно в 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза Serratia, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые могут быть использованы для превращения пептид-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, которые могут быть использованы для превращения пролекарств, содержащих D-аминокислотные заместители; углевод-расщепляющие ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, которые могут быть использованы для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β -лактамаза, которая может быть использована для превращения лекарственных средств, дериватизированных β -лактамами, в свободные лекарственные средства; и пенициллин-амидазы, такие как пенициллин V-амидаза или пенициллин G-амидаза, которые могут быть использованы для превращения лекарственных средств, дериватизированных у атомов азота амина феноксиацетильными или фенилацетильными группами, соответственно, в свободные лекарственные средства. Альтернативно антитела с ферментативной активностью, также известные специалистам

как «абзимы», могут быть использованы для превращения пролекарств согласно изобретению в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Конъюгаты «антитело-абзим» могут быть получены, как описано в настоящей заявке, для доставки абзима в популяцию опухолевых клеток.

5 Ферменты согласно изобретению могут быть ковалентно присоединены к анти-CD79b антителам методами, известными специалистам, например, с применением гетеробифункциональных перекрестно-сшивающих реагентов, обсуждаемых выше. Альтернативно гибридные белки, содержащие по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела согласно изобретению, связанную по меньшей мере с функционально
10 активной частью фермента согласно изобретению, могут быть сконструированы методами рекомбинантных ДНК, известными специалистам (см., например, Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984)).

D. Анти-CD79b антитело

Помимо описанных здесь анти-CD79b антител также рассматривается получение
15 вариантов анти-CD79b антител. Варианты анти-CD79b антител могут быть получены путем введения соответствующих нуклеотидных модификаций в кодирующую ДНК и/или путем синтеза нужного антитела или полипептида. Следует отметить, что аминокислотные модификации могут влиять на посттрансляционные процессы анти-CD79b антитела, например, изменять число или положения сайтов гликозилирования
20 или изменять мембрано-заякоривающие свойства.

Изменения в описанных здесь анти-CD79b антителах могут быть внесены, например, с применением любых методов и руководств по внесению консервативных и неконсервативных замен, описанных, например, в патенте США № 5364934. Такими модификациями могут быть замена, делеция или инсерция одного или нескольких
25 кодонов, кодирующих антитело или полипептид, что приводит к изменению аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью природного антитела или полипептида. Такой модификацией является, но необязательно, замена по меньшей мере одного аминокислотного остатка любой другой аминокислотой в одном или нескольких доменах анти-CD79b антитела. Для того чтобы определить,
30 можно ли встроить, заменить или deletировать аминокислотный остаток без какого-либо негативного воздействия на желаемую активность антитела, может быть проведено сравнение последовательности анти-CD79b антитела с последовательностью гомологичных известных молекул белков для минимизации числа модификаций аминокислотной последовательности, внесенных в области с высокой гомологией.
35 Аминокислотные замены могут быть результатом замены одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей аналогичные структурные и/или химические свойства, такой как замена лейцина серином, то есть консервативных аминокислотных замен. Инсерции или делеции могут, но необязательно, составлять в пределах примерно от 1 до 5 аминокислот. Допустимые модификации могут быть определены путем систематического
40 введения инсерций, делеций или замен аминокислот в данной последовательности и тестирования полученных вариантов на активность, обнаруживаемую полноразмерной или зрелой нативной последовательностью.

Настоящее изобретение также относится к фрагментам анти-CD79b антитела. Такие фрагменты могут иметь усечения у N-конца или у C-конца, либо они могут не содержать
45 внутренних остатков, например, по сравнению с полноразмерным нативным антителом или белком. В некоторых фрагментах отсутствуют аминокислотные остатки, которые не играют важной роли в нужной биологической активности анти-CD79b антитела.

Фрагменты анти-CD79b антитела могут быть получены любыми различными

стандартными методами. Нужные пептидные фрагменты могут быть получены методом химического синтеза. Альтернативный метод включает продуцирование фрагментов антитела или полипептида путем ферментативного расщепления, например, путем обработки белка ферментом, который, как известно, расщепляет белки в сайтах, определенных конкретными аминокислотными остатками, или путем гидролиза ДНК подходящими рестриктирующими ферментами и выделения нужного фрагмента. Еще один подходящий метод включает выделение и амплификацию ДНК-фрагмента, кодирующего нужный фрагмент антитела или полипептида с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Олигонуклеотиды, которые определяют нужные концы ДНК-фрагмента, используются в ПЦР в качестве 5'- и 3'-праймеров. Предпочтительно фрагменты анти-CD79b антитела обладают по меньшей мере одной биологической и/или иммунологической активностью, аналогичной активности описанного здесь нативного анти-CD79b антитела.

В конкретных вариантах изобретения представляющие интерес консервативные замены представлены в таблице 8 под заголовком «Предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть введены более значительные замены, называемые в таблице 8 «репрезентативными заменами», или также описанные ниже в разделе, относящемся к классу аминокислот, а затем полученные продукты могут быть скринированы.

Таблица 8

Исходные остатки	Репрезентативные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Значительные изменения функций или иммунологических свойств анти-CD79b антитела могут быть достигнуты путем выбора замен, которые значительно отличаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в нужном сайте, или (с) объема боковой цепи. Природные остатки подразделяются на нижеследующие группы по общим свойствам боковых цепей:

(1) гидрофобные остатки: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;

- (2) нейтральные гидрофильные остатки: cys, ser, thr;
- (3) кислотные остатки: asp, glu;
- (4) основные остатки: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические остатки: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены приводят к заменам члена одного из этих классов членом другого класса. Такие замены могут быть также введены в области консервативных замен, или, более предпочтительно, в остальные (неконсервативные) области.

Такие модификации могут быть внесены методами, известными специалистам, такими как олигонуклеотид-опосредуемый (сайт-направленный) мутагенез, аланин-сканирующий мутагенез и ПЦР-мутагенез. Для продуцирования варианта ДНК анти-CD79b антитела, клонированная ДНК может быть подвергнута сайт-направленному мутагенезу [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], кластерному мутагенезу [Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)], рестрикционному мутагенезу [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] или мутагенезу, проводимому другими методами.

Для идентификации одной или нескольких аминокислот по всей последовательности может быть также проведен сканирующий аминокислотный анализ. Предпочтительными сканирующими аминокислотами являются относительно небольшие нейтральные аминокислоты. Такими аминокислотами являются аланин, глицин, серин и цистеин. Обычно предпочтительной сканирующей аминокислотой для данной группы является аланин, поскольку он элиминирует боковую цепь за бета-углеродом и, очевидно, но с меньшей вероятностью, изменяет конформацию главной цепи данного варианта [Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. Аланин также является предпочтительным, поскольку он представляет собой наиболее распространенную аминокислоту. Кроме того, он часто присутствует как в скрытых, так и в открытых положениях [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Если аланиновая замена не дает адекватных количеств варианта, то может быть использована изотерическая аминокислота.

Для повышения устойчивости молекулы к окислению и для предотвращения образования нежелательных перекрестных связей, может быть также заменен любой цистеиновый остаток, не участвующий в поддержании «правильной» конформации анти-CD79b антитела, а обычно такой заменой является замена цистеина серином. И наоборот, для повышения его стабильности (а в частности, если антителом является его фрагмент, такой как Fv-фрагмент) к анти-CD79b антителу может (могут) быть добавлена(ы) цистеиновая(ые) связь(и).

Особенно предпочтительным вариантом замены является замена одного или нескольких остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). В общих чертах, полученный(ые) вариант(ы), выбранный(ные) для дальнейшей разработки, будет(ут) способствовать улучшению биологических свойств по сравнению со свойствами родительского антитела, от которого они происходят. Стандартный способ генерирования таких вариантов с заменами предусматривает созревание аффинности с применением метода фагового представления. Для этого несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) подвергают мутации для генерирования всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител могут быть представлены на частицах нитчатого фага в виде одновалентных гибридов с продуктом гена III, упакованных в каждой частице фага M13. Затем варианты, представленные

на фаге, скринируют на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как описано в настоящей заявке. Для идентификации сайтов гипервариабельной области, являющихся кандидатами на модификацию, может быть осуществлен аланин-сканирующий мутагенез, который позволяет идентифицировать

5 остатки гипервариабельной области, играющие важную роль в связывании с антигеном. Альтернативно или дополнительно может оказаться полезным проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации контактных участков между антителом и полипептидом CD79b. Такие контактные остатки и соседние

10 остатки являются кандидатами на замену, осуществляемую в соответствии с разработанными здесь способами. После получения таких вариантов панель этих вариантов подвергают скринингу, описанному в настоящей заявке, и антитела, обнаруживающие превосходные свойства в одном или нескольких релевантных анализах, могут быть выбраны для дальнейшего исследования.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей анти-CD79b антитела, получают различными методами, известными специалистам. Такими методами являются, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае природных вариантов аминокислотных последовательностей) или получение с помощью опосредуемого олигонуклеотидом (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кластерного мутагенеза ранее

20 полученного варианта или немодифицированного варианта анти-CD79b антитела.

Е. Модификации анти-CD79b антител

Ковалентные модификации анти-CD79b антител входят в объем настоящего изобретения. Одним из типов ковалентной модификации является реакция взаимодействия нужных аминокислотных остатков анти-CD79b антитела с органическим

25 дериватирующим агентом, способным реагировать с выбранными боковыми цепями N- или C- концевых остатков анти-CD79b антитела. Дериватизация с использованием бифункциональных агентов может быть осуществлена, например, для проведения перекрестного связывания анти-CD79b антитела с нерастворимой в воде матрицей-носителем или с поверхностью, используемых в методе очистки анти-CD79b антител,

30 и наоборот. Наиболее часто используемыми перекрестно-связывающими агентами являются, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидоэфиры, например, сложные эфиры, образованные 4-азидосалициловой кислотой; гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат),

35 бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан, и такие агенты, как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат.

Другими модификациями являются дезамидирование глутаминильных и аспарагинильных остатков до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков, соответственно; гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование

40 гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование α -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], ацетилирование N-концевого амина и амидирование любых C-концевых карбоксильных групп.

Другой тип ковалентной модификации анти-CD79b антитела, входящей в объем настоящего изобретения, включает изменение характера нативного гликозилирования антитела или полипептида. Термин «изменение характера нативного гликозилирования», используемый в описании настоящего изобретения, означает делецию одной или

нескольких углеводных групп, присутствующих в нативной последовательности анти-CD79b антитела (либо путем удаления скрытых сайтов гликозилирования, либо путем удаления гликозильных остатков химическими и/или ферментативными методами) и/или добавления одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в нативной последовательности анти-CD79b антитела. Кроме того, этот термин включает качественные изменения характера гликозилирования нативных белков, приводящие к изменению природы и количества различных присутствующих углеводных групп.

Гликозилирование антител и других полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование означает присоединение углеводной группы к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности “аспарагин-Х-серин” и “аспарагин-Х-треонин”, где Х означает любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводной части к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде способствует созданию потенциального сайта гликозилирования. O-связанное гликозилирование означает присоединение одного из сахаров, таких как N-ацетилгалактозамин, галактоза или ксилоза, к гидроксикампинокислоте, главным образом, к серину или треонину, хотя ими могут быть также 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Присоединение сайтов гликозилирования к анти-CD79b антителу обычно осуществляют путем такой модификации аминокислотной последовательности, в результате которой эта аминокислотная последовательность будет содержать одну или несколько вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Такая модификация может быть также осуществлена путем добавления к последовательности исходного анти-CD79b антитела одного или нескольких сериновых или треониновых остатков или их замены в такой последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования). Аминокислотная последовательность анти-CD79b антитела может быть, но необязательно, изменена посредством ее модификации на уровне ДНК, а в частности, посредством мутации ДНК, кодирующей анти-CD79b антитело, в предварительно выбранных основаниях, в результате чего будут образовываться кодоны, транслирующиеся в нужные аминокислоты.

Другим способом увеличения числа углеводных молекул на анти-CD79b антителе является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду. Такие методы описаны в литературе, например, в заявке WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в публикации Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Удаление углеводных групп, присутствующих на анти-CD79b антителе, может быть осуществлено химически или ферментативно, либо путем мутационной замены кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, которые служат в качестве мишеней для гликозилирования. Методы химического дегликозилирования известны специалистам и описаны, например, в публикации Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) и Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Ферментативное расщепление углеводных молекул на полипептидах может быть осуществлено с использованием различных эндо- и экзогликозидаз, как описано в публикации Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Другой тип ковалентной модификации анти-CD79b антитела включает связывание антитела с одной из различных молекул небелковых полимеров, таких как

полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, как описано в патентах США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 или 4179337. Антитело может быть также заключено в приготовленные микрокапсулы, например, методами коацервации или межфазной полимеризации (например, в гидроксиметилцеллюлозную или желатиновую микрокапсулу и полиметилметакрилатную микрокапсулу, соответственно), в системы для доставки коллоидальных лекарственных средств (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такая методика описана в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Анти-CD79b антитело согласно изобретению может быть также модифицировано с образованием химерных молекул, содержащих анти-CD79b антитело, связанное с другим гетерологичным полипептидом или с другой аминокислотной последовательностью.

В одном из вариантов изобретения такая химерная молекула содержит гибридный анти-CD79b антитела с полипептидной меткой, обеспечивающей наличие эпитопа, с которым может селективно связываться антитело против метки. Эпитопная метка обычно находится у amino- или карбокси-конца анти-CD79b антитела. Присутствие таких меченных эпитопом форм анти-CD79b антитела может быть детектировано с использованием антитела против полипептида-метки. Кроме того, наличие эпитопной метки позволяет легко очищать анти-CD79b антитело методом аффинной очистки с использованием анти-CD79b антитела против метки или аффинной матрицы другого типа, которая связывается с эпитопной меткой. Различные полипептиды-метки и их соответствующие антитела хорошо известны специалистам. Примерами являются полигистидиновые метки (поли-his) или метки «поли-гистидин-глицин (поли-his-gly); полипептидная метка НА вируса гриппа и антитело против этого полипептида, 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)], c-myc-метка и антитело против такой метки, 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; и метка «гликопротеин D (gD) вируса простого герпеса и антитело против такой метки [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Другими полипептидными метками являются Flag-пептид [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; пептид эпитопа KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; пептид эпитопа α -тубулина [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; и метка «пептид белка 10, кодируемого геном T7» [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

В альтернативном варианте изобретения химерная молекула может содержать гибридный «анти-CD79b антитело-иммуноглобулин или конкретная область иммуноглобулина». В случае двухвалентной формы химерной молекулы (также называемой «иммуноадгезином»), такой гибридный может быть присоединен к Fc-области молекулы IgG. IgG-гибриды предпочтительно включают замену по меньшей мере одной вариабельной области в молекуле Ig на растворимую форму (с делетированным или инактивированным трансмембранным доменом) анти-CD79b антитела. В особенно предпочтительном варианте изобретения гибридный иммуноглобулин включает шарнирную область, CH₂ и CH₃, или шарнирную область, CH₁, CH₂ и CH₃, молекулы IgG1. Описание продуцирования гибридных иммуноглобулинов можно также найти в патенте США № 5428130, выданном 27 июня 1995 г.

Е. Получение анти-CD79b антител

Ниже описано, главным образом, продуцирование анти-CD79b антител путем культивирования клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CD79b антитело. При этом

предусматривается, что для получения анти-CD79b антител могут быть применены альтернативные методы, хорошо известные специалистам. Так, например, соответствующая аминокислотная последовательность или ее части могут быть продуцированы методом прямого пептидного синтеза на твердой фазе [см. например, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. In vitro синтез белков может быть осуществлен вручную или автоматически. Автоматический синтез может быть осуществлен, например, на пептидном синтезаторе Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) в соответствии с инструкциями производителей. Различные части анти-CD79b антитела могут быть химически синтезированы отдельно и в комбинации с химическими или ферментативными методами с получением желаемого анти-CD79b антитела.

1. Выделение ДНК, кодирующей анти-CD79b антитело

ДНК, кодирующая анти-CD79b антитело, может быть получена из библиотеки кДНК, выделенной из ткани, которая предположительно содержит мРНК анти-CD79b антитела и экспрессирует такую мРНК на детектируемом уровне. В соответствии с этим, человеческая ДНК анти-CD79b антитела может быть легко получена из библиотеки кДНК, выделенной из человеческой ткани. Ген, кодирующий анти-CD79b антитело, может быть также получен из геномной библиотеки или с применением известных методов синтеза (например, автоматизированного синтеза нуклеиновых кислот).

Библиотеки могут быть скринированы с использованием зондов (таких как олигонуклеотиды, состоящие по меньшей мере примерно из 20-80 оснований), сконструированных в целях идентификации представляющего интерес гена или белка, кодируемого этим геном. Скрининг кДНК или геномной библиотеки с использованием выбранного зонда может быть осуществлен в соответствии со стандартными процедурами, таким как процедуры, описанные в публикации Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Альтернативным методом выделения гена, кодирующего анти-CD79b антитело, является ПЦР-технология [Sambrook et al., см. выше; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Методы скрининга библиотеки кДНК хорошо известны специалистам. Олигонуклеотидные последовательности, выбранные в качестве зондов, должны иметь длину, достаточную и достаточно точно определенную для минимизации ложноположительных результатов. Олигонуклеотиды предпочтительно метят так, чтобы они могли быть детектированы после гибридизации с ДНК в библиотеке, подвергаемой скринингу. Методы мечения хорошо известны специалистам и включают использование радиоактивных меток, таких как ³²P-меченый АТР, биотинилирование или ферментативное мечение. Условия гибридизации, включая условия умеренной и высокой жесткости, описаны в руководстве Sambrook et al., см. выше.

Последовательности, идентифицированные в таких методах скрининга библиотек, могут быть подвергнуты сравнению и выравниванию с другими известными последовательностями, депонированными и имеющимися в общедоступных базах данных, таких как GenBank или в других частных базах данных последовательностей. Идентичность последовательностей (на уровне аминокислот или нуклеотидов) в определенных областях молекулы или по всей полноразмерной последовательности может быть определена методами, известными специалистам и описанными в настоящей заявке.

Нуклеиновая кислота, имеющая белок-кодирующую последовательность, может

быть получена путем скрининга выбранной кДНК или геномных библиотек с использованием выведенной аминокислотной последовательности, впервые описанной в настоящей заявке, и если это необходимо, в соответствии со стандартными процедурами удлинения праймеров, описанными в руководстве Sambrook et al., см. выше, для обнаружения предшественников и процессинга промежуточных форм мРНК, которые не могут быть подвергнуты обратной транскрипции в кДНК.

2. Отбор и трансформация клеток-хозяев

Клетки-хозяева трансфицируют или трансформируют с использованием описанных здесь экспрессионных или клонирующих векторов в целях продуцирования анти-CD79b антител, а затем культивируют в стандартной питательной среде, модифицированной, если это необходимо, для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности. Условия культивирования, такие как среда, температура, pH и т.п. могут быть выбраны специалистом без лишнего экспериментирования. В основном, принципы, протоколы и практические методы максимизации продуктивности клеточных культур можно найти в публикации *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) и Sambrook et al., см. выше.

Методы трансфекции эукариотических и трансформации прокариотических клеток, включающие введение ДНК в клетку-хозяина в целях репликации ДНК либо в качестве внехромосомного, либо хромосомного интегратора, известны среднему специалисту в данной области, например, такими методами являются методы, опосредуемые CaCl_2 , CaPO_4 и липосомами, методы с использованием полиэтиленгликоля/ДМСО и электропорация. В зависимости от используемых клеток-хозяев, трансформацию осуществляют стандартными методами, подходящими для таких клеток-хозяев. В случае использования прокариотов обычно проводят обработку кальцием, а именно хлоридом кальция, как описано в руководстве Sambrook et al., см. выше, или электропорацию. Инфицирование *Agrobacterium tumefaciens* проводят в целях трансформации некоторых клеток растений, как описано в публикации Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) и в заявке WO 89/05859, опубликованной 29 июня 1989 г. В случае использования клеток млекопитающих, не содержащих клеточных стенок, может быть применен метод преципитации фосфатом кальция, описанный Graham и van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Общие аспекты трансфекции систем клеток-хозяев млекопитающих описаны в патенте США No. 4399216. Трансформацию в дрожжах обычно осуществляют методом, описанным Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946 (1977) и Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Однако для введения ДНК в клетки могут быть применены и другие методы, например, такие как микроинъекция в ядро, электропорация, слияние бактериальных протопластов с интактными клетками, либо методы с использованием поликатионов, например, полибрена, полиорнитина. Различные методы трансформации клеток млекопитающих можно найти в публикациях Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) и Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах являются прокариотические клетки, дрожжевые клетки или высшие эукариотические клетки.

а. Прокариотические клетки-хозяева

Подходящими прокариотами являются, но не ограничиваются ими, археобактерии и эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные микроорганизмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *E. coli*. Различные штаммы *E. coli* являются

общедоступными, такие как *E. coli* K12 штамм MM294 (ATCC 31446); *E. coli* X1776 (ATCC 31537); *E. coli* штамм W3110 (ATCC 27325) и K5 772 (ATCC 53635). Другими подходящими прокариотическими клетками-хозяевами являются Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41P, описанные в DD 266710, опубликованной 12 апреля 1989 г.), *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* и *Streptomyces*. Эти примеры приводятся лишь в иллюстративных, но не ограничивающих целях. Одним из наиболее предпочтительных хозяев или родительских клеток-хозяев является штамм W3110, поскольку он наиболее часто используется в качестве штамма-хозяина для ферментации рекомбинантных продуктов ДНК. Клетки-хозяева предпочтительно секретируют минимальное количество протеолитических ферментов. Так, например, штамм W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC, депозит № 27325) может быть модифицирован так, чтобы он имел генетическую мутацию в генах, кодирующих белки, которые являются эндогенными для хозяина, где примерами таких хозяев являются *E. coli* W3110 штамм 1A2, который имеет полный генотип *tonA*; *E. coli* W3110 штамм 9E4, который имеет полный генотип *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 штамм 27C7 (ATCC 55244), который имеет полный генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; *E. coli* W3110 штамм 37D6, который имеет полный генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 штамм 40B4, который представляет собой штамм 37D6 с делеционной мутацией *degP* и который не является резистентным к канамицину; *E. coli* W3110 штамм 33D3, имеющий генотип W3110 Δ *fhua* (Δ *tonA*) *ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R* (патент США № 5639635) и штамм *E. coli*, имеющий мутантную периплазматическую протеазу и описанный в патенте США № 4946783, выданном 7 августа 1990 г. Подходящими также являются и другие штаммы и производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Эти примеры приводятся лишь в целях иллюстрации и не являются ограничивающими. Методы конструирования производных любых вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны специалистам и описаны, например, Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Вообще говоря, соответствующие бактерии должны быть выбраны с учетом реплицируемости репликона в клетках бактерий. Так, например, клетки вида *E. coli*, *Serratia*, или *Salmonella* могут быть использованы в качестве хозяев, если для доставки репликона используются хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Обычно клетки-хозяева должны секретировать минимальное количество протеолитических ферментов, а при желании в клеточную культуру могут быть введены дополнительные ингибиторы протеазы. Альтернативно подходящими методами клонирования *in vitro* являются, например, ПЦР или другие полимеразные реакции нуклеиновых кислот.

Полноразмерное антитело, фрагменты антител и гибридные белки антител могут быть продуцированы в бактериях, а в частности, если отсутствует потребность в гликозилировании и в эффекторных функциях Fc, например, в том случае, если терапевтическое антитело конъюгировано с цитотоксическим средством (например, с токсином), а сам иммуноконъюгат является эффективным для деструкции опухолевых клеток. Полноразмерные антитела имеют более длительное время полужизни в кровотоке. Продуцирование в *E. coli* является более быстрым и менее дорогостоящим методом. Экспрессия фрагментов антител и полипептидов в бактериях

проиллюстрирована, например, в патенте США № 5648237 (Carter et. al.), в патенте США № 5789199 (Joly et al.), и в патенте США № 5840523 (Simmons et al.), где описаны последовательности области инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции, и указанные патенты вносятся в настоящее описание посредством ссылки. После экспрессии антитело выделяют из клеточной пасты *E. coli* в виде растворимой фракции, и такое антитело может быть очищено, например, на колонке с белком А или G-белком, в зависимости от изотипа. Конечная очистка может быть осуществлена способом, аналогичным способу очистки антител, экспрессируемых в клетках СНО.

б. Эукариотические клетки-хозяева

Помимо прокариотов, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих анти-CD79b антитело, являются эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы. Наиболее часто используемым низшим эукариотическим микроорганизмом-хозяином являются *Saccharomyces cerevisiae*.

Другими микроорганизмами являются *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290:140 [1981]; EP 139383, опубликованный 2 мая 1985 г.); клетки-хозяева *Kluyveromyces* (патент США № 4943529; Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)), такие как, например, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwannomyces*, такие как *Schwannomyces occidentalis* (EP 394538, опубликованный 31 октября 1990 г.); и нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (заявка WO 91/00357, опубликованная 10 января 1991 г.), и клетки-хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-1474 [1984]) и *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Подходящими также являются, но не ограничиваются ими, метилотропные дрожжи, например, дрожжи, способные расти на метаноле и выбранные из рода, состоящего из *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Rhodotorula*. Список конкретных видов, принадлежащих к этому классу дрожжей, можно найти в публикации C. Anthony, *The Biochemistry of Methylophilic*, 269 (1982).

Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии и гликозилирования анти-CD79b антитела, могут быть получены из многоклеточных организмов. Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9, а также клетки растений, такие как клеточные культуры хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов и табака. Были идентифицированы различные бакуловирусные штаммы и варианты, и соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых, происходящие от таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Ряд вирусных штаммов для трансфекции является общедоступным, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут быть использованы в качестве вируса согласно изобретению, а в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Однако наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) становится рутинной процедурой.

Примерами подходящих клеточных линий хозяев млекопитающих являются клетки почек обезьяны CV1, трансформированные вирусом SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); клеточная линия почек человеческого эмбриона (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки 5 почек детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек 10 собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени лабораторной крысы Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухолевые клетки мышинной молочной железы (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и клеточная линия человеческой гепатомы (Hep G2).

15 Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными экспрессирующими или клонирующими векторами для продуцирования анти-CD79b антитела и культивируют в стандартной питательной среде, модифицированной, если это необходимо, для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности.

20 3. Отбор и применение реплицирующегося вектора

Для рекомбинантного продуцирования антитела согласно изобретению, нуклеиновую кислоту (например, кДНК или геномную ДНК), кодирующую такое антитело, выделяют и встраивают в реплицируемый вектор для последующего клонирования (амплификации ДНК) или экспрессии. ДНК, кодирующая антитело, может быть легко выделена и 25 секвенирована в соответствии со стандартными процедурами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Для этой цели подходящими являются многие векторы. Выбор вектора отчасти зависит от используемой клетки-хозяина. В основном, предпочтительными клетками-хозяевами являются либо 30 прокариотические клетки, либо эукариотические клетки (обычно клетки млекопитающих).

Этот вектор может быть, например, получен в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага. Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты может быть встроена в вектор в соответствии с различными процедурами. В основном, ДНК 35 встраивают в соответствующий(ие) сайт(ы) рестриктирующей эндонуклеазы методами, известными специалистам. Векторными компонентами обычно являются, но не ограничиваются ими, одна или несколько сигнальных последовательностей, ориджин репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. Конструирование подходящих векторов, 40 содержащих один или несколько из указанных компонентов, осуществляют стандартными методами лигирования, известными специалистам.

CD79b может быть продуцирован рекомбинантно не только прямым методом, но также в виде гибрида полипептида с гетерологичным полипептидом, который может представлять собой сигнальную последовательность, или с другим полипептидом, 45 имеющим специфический сайт расщепления у N-конца зрелого белка или полипептида. В общих чертах, указанной сигнальной последовательностью может быть компонент вектора, либо такой последовательностью может быть часть ДНК, кодирующая анти-CD79b антитело, которую встраивают в данный вектор. Сигнальной

последовательностью может быть прокариотическая сигнальная последовательность, выбранная, например, из группы, состоящей из лидерной последовательности щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *lpp* или термостабильного энтеротоксина II. Для секреции в дрожжах сигнальной последовательностью может быть, например, лидерная последовательность дрожжевой инвертазы, лидерная последовательность альфа-фактора (включая лидерные последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluveromyces*, причем вторая из этих последовательностей описана в патенте США № 5010182), или лидерная последовательность кислой фосфатазы, лидерная последовательность глюкоамилазы *C. albicans* (патент EP 362179, опубликованный 4 апреля 1990 г.), или сигнальная последовательность, описанная в заявке WO 90/13646, опубликованной 15 ноября 1990 г. При экспрессии в клетках млекопитающих, для прямой секреции белка могут быть использованы сигнальные последовательности млекопитающих, такие как сигнальные последовательности, происходящие от секретируемых полипептидов того же самого вида или родственных видов, а также вирусные секреторные лидерные последовательности.

а. Прокариотические клетки-хозяева

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела согласно изобретению, могут быть получены стандартными рекомбинантными методами. Нужные полинуклеотидные последовательности могут быть выделены и секвенированы из антитело-продуцирующих клеток, таких как гибридомные клетки. Альтернативно полинуклеотиды могут быть синтезированы с помощью синтезатора нуклеотидов или ПЦР-методами. После получения последовательностей, кодирующих полипептиды, эти последовательности встраивают в рекомбинантный вектор, способный реплицироваться и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. В целях настоящего изобретения могут быть использованы многие доступные и известные векторы. Выбор соответствующего вектора зависит, главным образом, от размера нуклеиновых кислот, встраиваемых в указанный вектор, и от конкретной клетки-хозяина, трансформируемой этим вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты, в зависимости от его функции (амплификации или экспрессии гетерологичного полинуклеотида или того и другого) и от его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится.

В основном, плазмидные векторы, содержащие репликон и регуляторные последовательности, происходящие от видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются вместе с этими же хозяевами. Такие экспрессирующие и клонирующие векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, способствующую репликации вектора в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах, а также последовательности-маркеры, позволяющие проводить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Такие последовательности различных бактерий, дрожжей и вирусов хорошо известны. Оридгин репликации, происходящий от плазмиды pBR322 и содержащий гены, кодирующие резистентность к ампициллину (Amp) и к тетрациклину (Tet), а также позволяющий легко идентифицировать трансформированные клетки, является подходящим для большинства грамотрицательных бактерий; ориджин плазмиды 2 μ является подходящим для дрожжей, а различные вирусные ориджины (SV40, вируса полиомы, аденовируса, VSV или BPV) являются подходящими для клонирования векторов в клетки млекопитающих. pBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг могут также содержать промоторы, которые могут быть использованы этим микробным организмом для экспрессии эндогенных белков, либо они могут быть модифицированы так, чтобы они содержали такие

промоторы. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в патенте США № 5648237, Carter et al.

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и регуляторные последовательности, совместимые с микроорганизмом-хозяином, могут быть

использованы в качестве трансформирующих векторов в комбинации с этими хозяевами. Так, например, бактериофаг, такой как λ GEMTM-11, может быть использован для получения рекомбинантного вектора, который может быть применен для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как E. coli LE392.

Экспрессионный вектор согласно изобретению может содержать две или более пар промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотором является нетранслируемая регуляторная последовательность, локализованная выше (со стороны 5'-конца) от цистрона, модулирующего ее экспрессию. Прокариотические промоторы обычно подразделяются на два класса, индуцибельные и конститутивные. Индуцибельным промотором является промотор, который инициирует повышение

уровней транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменения условий культивирования, например, в присутствии или при отсутствии питательных элементов или при изменении температуры. Большинство промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами, хорошо известны специалистам. Выбранный промотор может быть функционально присоединен к цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем выделения промотора из ДНК-источника посредством ее гидролиза рестриктивными ферментами и встраивания выделенной промоторной последовательности в вектор согласно изобретению. Нативная промоторная последовательность и многие гетерологичные промоторы могут быть использованы для прямой амплификации и/или экспрессии генов-мишеней. В некоторых вариантах изобретения используются гетерологичные промоторы, поскольку они, по сравнению с нативным промотором для нужных полипептидов, позволяют значительно повышать уровень транскрипции и увеличивать выходы экспрессируемого гена-мишени.

Промоторы, распознаваемые различными потенциальными клетками-хозяевами, хорошо известны специалистам. Промоторами, подходящими для использования в прокариотических хозяевах, являются промотор PhoA, промоторные системы β -галактамазы и лактозы [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], промоторная система щелочной фосфатазы и триптофана (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36776] и гибридные промоторы, такие как промотор tac [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)] или промотор trc. Промоторы, используемые в бактериальных системах, также могут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально присоединенную к ДНК, кодирующей анти-CD79b антитело. Однако могут быть также использованы и другие промоторы, которые являются функциональными в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Нуклеотидные последовательности этих промоторов были опубликованы, что облегчает специалистам в данной области проводить их функциональное лигирование с цистронами, кодирующими нужные легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20:269), с использованием линкеров или адаптеров для доставки всех требуемых рестрикционных сайтов.

В одном из аспектов изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит такой компонент, как секреторная сигнальная последовательность, регулирующая транслокацию экспрессируемых полипептидов через мембрану. В общих чертах, указанной сигнальной последовательностью может быть компонент вектора,

либо такой последовательностью может быть часть нужного ДНК-полипептида, встраиваемого в этот вектор. Сигнальной последовательностью, выбранной в целях осуществления изобретения, должна быть последовательность, распознаваемая и процессируемая (то есть отщепляемая сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. В случае использования прокариотических клеток-хозяев, не распознающих и не процессирующих сигнальные последовательности, которые являются нативными для гетерологичных полипептидов, эту сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерной последовательности щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA и MBP. В одном из вариантов изобретения сигнальными последовательностями, используемыми в обоих цистронах экспрессионной системы, являются сигнальные последовательности STII или их варианты.

В другом аспекте изобретения продуцирование иммуноглобулинов согласно изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина, и поэтому в данном случае не требуется присутствия секретирующих сигнальных последовательностей в каждом цистроне. В соответствии с этим, легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессируются и подвергаются укладке и сборке с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Некоторые штаммы хозяев (например, trxB⁻-штаммы *E. coli*) имеют соответствующие условия в цитоплазме, которые благоприятствуют образованию дисульфидных связей, и тем самым способствуют правильной укладке и сборке субъединиц экспрессируемого белка. Proba & Pluckthun, *Gene*, 159:203 (1995).

Настоящее изобретение относится к экспрессионной системе, в которой количественное отношение экспрессируемых полипептидных компонентов может быть смодулировано для максимизации выхода секретируемых и соответствующим образом собранных антител согласно изобретению. Такую модуляцию осуществляют по меньшей мере частично посредством одновременной модуляции активности трансляции полипептидных компонентов.

Один из методов модуляции трансляционной активности описан в патенте США 5840523 Simmons et al. В этом методе используются варианты области инициации трансляции (TIR) в цистроне. Для данной TIR может быть создана серия вариантов аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты с рядом трансляционных активностей, что дает возможность корректировать этот фактор для достижения нужного уровня экспрессии конкретной цепи. Варианты TIR могут быть продуцированы стандартными методами мутагенеза, в результате чего в кодонах могут быть внесены изменения, которые могут модифицировать аминокислотную последовательность, хотя предпочтительными являются молчащие мутации в нуклеотидной последовательности. Модификациями в TIR могут быть, например, изменения числа последовательностей Шайна-Дальгарно или расстояния между ними, а также изменения в сигнальной последовательности. Одним из способов получения мутантных сигнальных последовательностей является создание «банка кодонов» в начале кодирующей последовательности, которая не изменяет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (то есть такие модификации являются молчащими). Это может быть достигнуто путем замены третьего нуклеотида каждого кодона, а также замены некоторых аминокислот, таких как лейцин, серин и аргинин, во многих первых и вторых положениях, которые могут создавать определенные трудности при получении такого банка. Этот метод мутагенеза подробно описан в публикации Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.

4:151-158.

Набор векторов предпочтительно генерируют с использованием TIR-активности для каждого цистрона. Этот ограниченный набор дает возможность сравнивать уровни экспрессии каждой цепи, а также выходы нужных продуктов антител при различных комбинациях TIR-активности. TIR-активность может быть определена путем количественной оценки уровней экспрессии гена-репортера как подробно описано в патенте США № 5840523 Simmons et al. Исходя из сравнения трансляционных активностей, могут быть выбраны отдельные нужные TIR, которые могут быть объединены в конструкциях экспрессионных векторов согласно изобретению.

10 б. Эукариотические клетки-хозяева

Компонентами векторов обычно являются, но не ограничиваются ими, один или несколько из следующих компонентов: сигнальная последовательность, ориджин репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминирования транскрипции.

15 (i) Компонент сигнальная последовательность

Вектор, используемый в эукариотических клетках-хозяевах, может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления у N-конца зрелого белка, или представляющий интерес полипептид. Выбранной гетерологичной сигнальной последовательностью предпочтительно является последовательность, которая распознается и процессируется (то есть отщепляется 20 сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для экспрессии в клетках млекопитающих используются сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD вируса простого герпеса.

25 ДНК для такой области предшественника лигируют с антитело-кодирующей ДНК с сохранением рамки считывания.

(2) Ориджин репликации

Обычно такой компонент, как ориджин репликации, не является необходимым для экспрессионных векторов млекопитающих. Так, например, ориджин репликации SV40 30 обычно используется только потому, что он содержит ранний промотор.

(3) Компонент селективный ген

Экспрессионный и клонирующий векторы обычно содержат селективный ген, также называемый селективным маркером. Обычно селективные гены кодируют белки, которые (а) сообщают резистентность к антибиотиками или к другим токсинам, 35 например, к ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) компенсируют дефицит, обусловленный ауксотрофией, если это необходимо, или (с) обеспечивают доставку важных питательных веществ, которые не поступают из комплексных сред, например, гена, кодирующего D-аланин-рацемазу для Bacilli.

Одним из примеров схемы отбора является использование лекарственного средства, 40 прекращающего рост клетки-хозяина. Клетки, которые были успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, сообщающий резистентность к лекарственному средству и тем самым способствующий выживанию этих клеток в селективной среде. Для такого доминантного отбора могут быть использованы, например, лекарственные средства, такие как неомицин, микофеноловая 45 кислота и гиромидин.

Примером подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные встраивать нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CD79b антитело, такую как гены DHFR,

тимидинкиназы, металлотионеина-I и II, а предпочтительно гены, кодирующие металлотионеин приматов, аденозин-дезаминазу, орнитин-декарбоксилазу и т.п. В случае DHFR дикого типа подходящей клеткой хозяином является клеточная линия CHO, дефицитная по DHFR-активности (например, ATCC CRL-9096), и такая клеточная
 5 линия была получена и размножена, как описано в публикации Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Так, например, клетки, трансформированные селективным геном DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Альтернативно клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, содержащие
 10 эндогенный DHFR), трансформированные или ко-трансформированные ДНК-последовательностями, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть отобраны путем культивирования клеток в среде, содержащей агент для отбора, проводимого с использованием селективного маркера, такого как аминокликозидный
 15 антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199.

Подходящим селективным геном для использования в дрожжах является ген *trp1*, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. Ген *trp1* представляет собой селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, который
 20 не способен расти в присутствии триптофана, например, штамма, депонированного в ATCC № 44076 или PER4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

(4) Компонент промотор

Экспрессионные и клонирующие векторы обычно содержат промотор, функционально присоединенный к последовательности нуклеиновой кислоты,
 25 кодирующей анти-CD79b антитело, для прямого синтеза мРНК. Промоторы, распознаваемые различными потенциальными клетками-хозяевами, хорошо известны специалистам.

Фактически, все гены эукариотов имеют АТ-богатую область, локализованную приблизительно в области, расположенной на 25-30 нуклеотидов выше от сайта
 30 инициации транскрипции. Другой такой последовательностью, локализованной приблизительно в области, расположенной на 70-80 нуклеотидов выше от сайта инициации транскрипции многих генов, является область CNCAAT, где N может означать любой нуклеотид. У 3'-конца большинства эукариотических генов расположена последовательность AATAAA, которая может служить сигналом для присоединения
 35 poly A-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все указанные последовательности могут быть соответствующим образом встроены в эукариотические экспрессионные векторы.

Примерами промоторных последовательностей, подходящих для использования в дрожжевых клетках-хозяевах, являются промоторы 3-фосфоглицерат-киназы [Hitzeman
 40 et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] или других гликолитических ферментов [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], таких как энолаза, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, гексокиназа, пируват-декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат-изомераза, 3-фосфоглицерат-мутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Другими дрожжевыми промоторами, которые представляют собой индуцибельные промоторы, имеющие дополнительное преимущество, заключающееся в их способности
 45 регулировать транскрипцию в определенных условиях культивирования, являются промоторные области генов алкоголь-дегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой

фосфатазы, гидролитических ферментов, ассоциированных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Векторы и промоторы, подходящие для экспрессии в дрожжах, также описаны в EP 73657.

- 5 Транскрипция анти-CD79b антител из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих регулируется, например, промоторами, полученными из геномов таких вирусов, как вирус полиомы, вирус оспы домашней птицы (заявка UK 2211504, опубликованная 5 июля 1989 г.), аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус коровьей папилломы, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В, а наиболее
- 10 предпочтительно обезьяний вирус 40 (SV40); гетерологичными промоторами млекопитающих, например, промотором актина или промотором иммуноглобулина; и промоторами белков теплового шока, при условии, что такие промоторы являются совместимыми с системами клеток-хозяев.

- Ранние и поздние промоторы вируса SV40 обычно получают в виде рестрикционного
- 15 фрагмента SV40, который также содержит ориджин репликации вируса SV40. Предранний промотор человеческого цитомегаловируса обычно получают в виде рестрикционного HindIII-фрагмента E. Система экспрессии ДНК в клетках-хозяевах млекопитающих, полученная на основе коровьего папилломавируса, используемого в качестве вектора, описана в патенте США № 4419446. Модификация такой системы
- 20 описана в патенте США № 4601978. Экспрессия кДНК человеческого β -интерферона в мышинных клетках под контролем промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса также описана в публикации Reyers et al., Nature 297:598-601 (1982). Альтернативно, в качестве промотора может быть использован вирус саркомы Рауса, имеющий длинный концевой повтор.

- 25 (5) Компонент энхансерный элемент

- Транскрипция ДНК, кодирующей анти-CD79b антитело, в высших эукариотах может быть усилена при встраивании в вектор энхансерной последовательности. Энхансерами являются цис-действующие элементы ДНК, обычно примерно от 10 до 300 п.н., которые, действуя на промотор, усиливают его активность в инициации транскрипции. В
- 30 настоящее время известно много энхансерных последовательностей, происходящих от генов млекопитающих (генов глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Однако обычно используется энхансер от вируса эукариотической клетки. Примерами является энхансер вируса SV40, локализованный в поздней области ориджина репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса,
- 35 энхансер полиомавируса, локализованный в поздней области ориджина репликации, и энхансеры аденовируса. См. также публикацию Yaniv, Nature 297:17-18 (1982), в которой описаны энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в 5'- или 3'-положении по отношению к последовательности, кодирующей анти-CD79b антитело, но предпочтительно, чтобы
- 40 он находился в 5'-положении от промотора.

- (6) Компонент сайт терминции транскрипции

- Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (в дрожжах, грибах, насекомых, растениях, у животных, у человека или в ядродержащих клетках, происходящих от других многоклеточных организмов), также содержат
- 45 последовательности, необходимые для терминции транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно расположены со стороны 5'-конца, а иногда 3'-конца от нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные в виде

полиаденилированных фрагментов в нетранслированной части мРНК, кодирующей анти-CD79b антитело. Одним из подходящих компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования коровьего гормона роста. См. описание экспрессионных векторов в WO 94/11026 и в настоящей заявке.

- 5 Другие методы, векторы и клетки-хозяева, подходящие для адаптации к синтезу анти-CD79b антитела в рекомбинантных клеточных культурах позвоночных, описаны в публикации Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); в EP 117060 и EP 117058.

4. Культивирование клеток-хозяев

- 10 Клетки-хозяева, используемые для продуцирования анти-CD79b антитела согласно изобретению, могут быть культивированы в различных средах.

а. Прокариотические клетки-хозяева

- Прокариотические клетки, используемые для продуцирования полипептидов согласно изобретению, культивируют в среде, известной специалистам и подходящей для
15 культивирования выбранных клеток-хозяев. Примерами подходящей среды являются бульон Луриа (LB) с необходимыми питательными добавками. В некоторых вариантах изобретения такая среда также содержит средство для отбора, выбранное исходя из конструирования экспрессионного вектора, которое способствуют селективному росту прокариотических клеток, содержащих экспрессионный вектор. Так, например, в среду
20 для культивирования клеток, экспрессирующих ген резистентности к ампициллину, добавляют ампициллин.

- Помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, в среду могут быть также включены любые необходимые добавки в соответствующих концентрациях, вводимые как отдельно, так и в смеси с другими добавками или средой, такими как
25 комплексный источник азота. Культуральная среда может, но необязательно, содержать один или несколько восстановителей, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолята, дитиоэритритола и дитиотреитола.

- Прокариотические клетки-хозяева культивируют при соответствующих температурах. Для культивирования *E. coli*, предпочтительной температурой является, например,
30 температура примерно от 20°C до 39°C, более предпочтительно примерно от 25°C до 37°C, а еще более предпочтительно примерно при 30°C. pH среды может варьировать в пределах примерно от 5 до 9, в зависимости, главным образом, от организма хозяина. Для *E. coli* pH составляет предпочтительно примерно от 6,8 до 7,4, а более предпочтительно примерно 7,0.

- 35 Если в экспрессионном векторе согласно изобретению используется индуцибельный промотор, то экспрессия белка индуцируется в условиях, подходящих для активации данного промотора. В одном из аспектов изобретения для регуляции транскрипции полипептидов используются промоторы PhoA. В соответствии с этим, трансформированные клетки-хозяева культивируют в среде для индуцирования с
40 ограниченным содержанием фосфата. Предпочтительной средой с ограниченным содержанием фосфата является среда C.R.A.P. (см., например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002) 263:133-147). В комбинации с используемой векторной конструкцией могут быть использованы и различные другие индукторы, известные специалистам.

- В одном из вариантов изобретения, экспрессируемые полипептиды согласно
45 изобретению секретируются в периплазму клеток-хозяев и могут быть выделены из этой периплазмы. Выделение белка, главным образом, осуществляют путем дизрупции микроорганизма, обычно такими методами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После дизрупции клеток клеточный дебрис или целые клетки

могут быть удалены путем центрифугирования или фильтрации. Эти белки могут быть дополнительно очищены, например, с помощью хроматографии на аффинной смоле. Альтернативно белки могут транспортироваться в клеточную среду и отделяться от нее. Клетки могут быть удалены из культуры, а супернатант культуры может быть

5 подвергнут фильтрации и концентрированию для дополнительной очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть затем выделены и идентифицированы хорошо известными методами, такими как электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и Вестерн-блот-анализ.

В одном из аспектов изобретения антитела продуцируют в большом количестве

10 посредством ферментации. Для получения рекомбинантных белков могут быть проведены различные крупномасштабные процедуры ферментации в культуре с подпиткой. Крупномасштабную ферментацию проводят в ферментере емкостью по меньшей мере 1000 литров, а предпочтительно примерно от 1000 до 100000 литров. Такие ферментеры снабжены лопастной мешалкой для равномерного распределения

15 кислорода и микроэлементов, а в частности, глюкозы (предпочтительного источника углерода/энергии). Термин “лабораторная ферментация”, в общих чертах, означает ферментацию в ферментере объемом не более чем примерно 100 литров, и такой объем может варьировать примерно от 1 литра до 100 литров.

В процессе ферментации индуцирование экспрессии белков обычно инициируют

20 после того, как клетки, культивируемые в подходящих условиях, достигнут нужной плотности, например, OD₅₅₀, составляющей примерно 180-220, то есть ранней стационарной фазы. В комбинации с используемой векторной конструкцией могут быть использованы и различные другие индукторы, известные специалистам и описанные выше. Перед индуцированием клетки могут быть культивированы в течение меньшего

25 периода времени. Клетки обычно индуцируют в течение примерно 12-50 часов, хотя время индуцирования может быть увеличено или уменьшено.

Для увеличения выхода продукта и для улучшения качества полипептидов согласно изобретению могут быть изменены различные условия ферментации. Так, например, для обеспечения “правильной” сборки и укладки секретированных полипептидов

30 антител могут быть использованы дополнительные векторы, в которых происходит сверхэкспрессия белков-шаперонов, таких как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил- цис, транс-изомераза с шаперонной активностью), и которые предназначены для ко-трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было продемонстрировано, что белки-шапероны облегчают правильную укладку и

35 растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) J. Bio. Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann & Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm & Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

40 Для минимизации протеолиза экспрессируемых гетерологичных белков (а в частности, белков, которые являются протеолитически чувствительными), в настоящем изобретении могут быть использованы некоторые штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Так, например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы для введения генетической(их) мутации(й) в гены, кодирующие

45 известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые дефицитные по протеазе штаммы E. coli являются доступными и описаны, например, в публикации Joly et al. (1998), см. выше; Georgiou et al., патент США № 5264365; Georgiou et al., патент

США № 5508192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

В одном из вариантов изобретения штаммы *E. coli*, дефицитные по протеолитическим ферментам и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или несколько белков-шаперонов, используются в качестве клеток-хозяев в экспрессионной

5. б. Эукариотические клетки-хозяева

Коммерчески доступными средами, подходящими для культивирования клеток-хозяев, являются среды, такие как среда Хэмса F10 (Sigma), минимальная поддерживающая среда ((MEM)(Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM), Sigma). Кроме того, в качестве культуральной среды для культивирования клеток-хозяев может быть использована любая среда, описанная в публикации Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), в патентах США №№ 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 или 5122469; в WO 90103430; в WO 87/00195 или в патенте США Re.№ 30985. В любую из этих сред могут быть добавлены, если это необходимо, гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как хлорид натрия и фосфат кальция и магния), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аднозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственное средство гентамицинTM), микроэлементы (определенные как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярных дозах) и глюкоза или эквивалентный источник энергии. Могут быть также включены любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, известных специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., аналогичны условиям, ранее используемым для экспрессии выбранных клеток-хозяев, и известны среднему специалисту в данной области.

5. Детекция амплификации/экспрессии гена

Амплификация и/или экспрессия гена может быть измерена в образце непосредственно, например, с помощью Саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга для количественной оценки транскрипции мРНК [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттинга (анализа ДНК), или гибридизации *in situ* с использованием соответствующим образом помеченного зонда, исходя из описанной здесь последовательности. Альтернативно могут быть использованы антитела, которые могут распознавать специфические дуплексы, включая ДНК-дуплексы, РНК-дуплексы и гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. Антитела, в свою очередь, могут быть помечены, и может быть проведен анализ, в котором дуплекс присоединяют к поверхности так, чтобы после образования дуплекса на поверхности можно было детектировать присутствие антитела, связанного с дуплексом.

Альтернативно экспрессия гена может быть измерена иммунологическими методами, такими как иммуногистохимическое окрашивание клеток или тканевых срезов и анализ клеточной культуры или физиологических жидкостей для прямой и количественной оценки экспрессии генного продукта. Антитела, подходящие для иммуногистохимического окрашивания и/или анализа образцов физиологической жидкости, могут быть моноклональными или поликлональными и могут быть получены у любого млекопитающего. В основном могут быть получены антитела против нативной последовательности полипептида CD79b или против синтетического пептида, полученного на основе описанных здесь последовательностей ДНК, или против экзогенной последовательности, присоединенной к ДНК CD79b и кодирующей эпитоп для специфического антитела.

6. Очистка анти-CD79b антитела

Формы анти-CD79b антитела могут быть выделены из культуральной среды или из лизатов клеток-хозяев. Если антитела являются мембраносвязанными, то они могут быть выделены из мембраны с использованием подходящего раствора детергента (например, тритона X-100) или путем ферментативного расщепления. Клетки, используемые для экспрессии анти-CD79b антитела, могут быть подвергнуты дизрупции различными физическими или химическими методами, такими как проведение цикла замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком, механическая дизрупция или использование агентов для лизиса клеток.

Может оказаться желательной очистка анти-CD79b антитела от рекомбинантных клеточных белков или полипептидов. Подходящими методами очистки являются следующие методы: фракционирование на ионообменной колонке, преципитация этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на двуокиси кремния или на катионообменной смоле, такой как DEAE; хроматофокусирование, электрофорез в ДСН-ПААГ, преципитация сульфатом аммония; гель-фильтрация с использованием, например, сефадекса G-75; очистка на колонках с белок А-сефарозой для удаления примесей, таких как IgG; и очистка на колонках, образующих хелатные комплексы с металлом, связывающиеся с мечеными эпитопом формами анти-CD79b антитела. Могут быть применены различные методы очистки белков, и такие методы известны специалистам и описаны, например, в публикации Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Выбор стадии(й) очистки зависит, например, от природы используемого способа продуцирования и от конкретно продуцируемого анти-CD79b антитела.

С применением техники рекомбинантных ДНК антитело может быть продуцировано внутри клеток, либо оно может быть непосредственно секретировано в среду. Если в первой стадии антитело продуцируется внутри клеток, то клеточный дебрис или клетки-хозяева или их лизированные фрагменты удаляют, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. В публикации Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описана процедура выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную пасту оттаивают в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 минут. Клеточный дебрис может быть удален путем центрифугирования. Если антитело секретируется в среду, то обычно сначала концентрируют супернатанты, полученные из таких экспрессионных систем, с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon®. Для ингибирования протеолиза в любой из предшествующих стадий может быть использован ингибитор протеазы, такой как PMSF, а для предупреждения размножения случайно вносимых примесных микроорганизмов могут быть использованы антибиотики.

Композиция антитела, полученная из клеток, может быть очищена, например, с помощью хроматографии на гидроксипатитах, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, при этом предпочтительным методом очистки является аффинная хроматография. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любого Fc-домена иммуноглобулина, присутствующего в данном антителе. Белок А может быть использован для очистки антител, содержащих тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человеческого иммуноглобулина (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Для всех мышинных изотипов и для человеческой цепи $\gamma 3$ рекомендуется G-белок (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). В качестве матрицы, с которой связывается

аффинный лиганд, наиболее часто используется агароза, но могут быть использованы и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с регулируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокую скорость потока и позволяют сократить время обработки, чем это может быть достигнуто с использованием агарозы. Если антитело содержит домен C_{H3} , то для его очистки может

быть использована смола Bakerbond ABXTM (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). В зависимости от выделяемого антитела могут быть также применены и другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, преципитация этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на двуокиси кремния, хроматография на гепарин-сефарозеTM, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, электрофорез в ДСН-ПААГ и преципитация сульфатом аммония.

После проведения любой(ых) предварительной(ых) стадии(й) очистки, смесь, содержащая представляющее интерес антитело и примеси, может быть подвергнута гидрофобной хроматографии при низком рН с использованием элюирующего буфера при рН примерно 2,5-4,5, а предпочтительно при низкой концентрации соли (например, примерно 0-0,25 М).

Г. Фармацевтические композиции

Конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (ADC) согласно изобретению могут быть введены любым способом, подходящим для лечения данного состояния. ADC обычно вводят парентерально, то есть путем вливания, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, интратекально и эпидурально.

В одном из вариантов изобретения, для лечения раковых заболеваний, конъюгат «антитело-лекарственное средство» вводят путем внутривенного вливания. Доза, вводимая путем вливания, составляет в пределах от примерно 1 мкг/м² до примерно 10000 мкг/м² на дозу, и обычно вводится один раз в неделю, а всего могут быть введены одна, две, три или четыре дозы. Альтернативно такая доза составляет примерно от 1 мкг/м² до 1000 мкг/м², примерно от 1 мкг/м² до 800 мкг/м², примерно от 1 мкг/м² до 600 мкг/м², примерно от 1 мкг/м² до 400 мкг/м², примерно от 10 мкг/м² до 500 мкг/м², примерно от 10 мкг/м² до 300 мкг/м², примерно от 10 мкг/м² до 200 мкг/м² и примерно от 1 мкг/м² до 200 мкг/м². Для устранения или ослабления симптомов заболевания доза может быть введена один раз в день, один раз в неделю, несколько раз в неделю, но при этом не каждый день; несколько раз в месяц, но при этом не каждый день; несколько раз в месяц, но при этом не каждую неделю; один раз в месяц или периодически. Введение может осуществляться в течение любого из указанных промежутков времени, до тех пор, пока не будет достигаться уменьшение опухоли или ослабление симптомов лимфомы и лейкоза, подвергаемого лечению. Введение может быть продолжено после ремиссии или ослабления симптомов заболевания, в случае, если при таком непрерывном введении ремиссия или ослабление симптомов все еще продолжают.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения аутоиммунного заболевания, где указанный способ включает введение пациенту, страдающему аутоиммунным заболеванием, терапевтически эффективного количества конъюгата «гуманизированное антитело МА79b-лекарственное средство» в соответствии с любым из предыдущих вариантов. В предпочтительных вариантах изобретения антитело вводят внутривенно или подкожно. Указанный конъюгат «антитело-лекарственное средство»

вводят внутривенно в дозе, составляющей примерно от 1 мкг/м² до 100 мг/м² на дозу, а в конкретном варианте изобретения от 1 мкг/м² и примерно до 500 мкг/м². Для устранения или ослабления симптомов заболевания доза может быть введена один раз в день, один раз в неделю, несколько раз в неделю, но при этом не каждый день; несколько раз в месяц, но при этом не каждый день; несколько раз в месяц, но при этом не каждую неделю; один раз в месяц или периодически. Введение может осуществляться в течение любого из указанных промежутков времени, до тех пор, пока не будет достигаться устранение или ослабление симптомов указанного аутоиммунного заболевания, подвергаемого лечению. Введение может быть продолжено после ремиссии или ослабления симптомов заболевания, в случае, если при таком непрерывном введении такая ремиссия или ослабление симптомов все еще продолжается.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения В-клеточного расстройства, включающему введение пациенту, страдающему В-клеточным расстройством, таким как В-клеточно-пролиферативное расстройство (включая, но не ограничиваясь ими, лимфому и лейкоз), или аутоиммунным заболеванием, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела МА79b в соответствии с любым из предыдущих вариантов, где указанное антитело не является конъюгированным с цитотоксической молекулой или с детектируемой молекулой.

Указанное антитело обычно вводят в дозе примерно от 1 мкг/м² до 1000 мг/м².

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одно анти-CD79b антитело и/или по меньшей мере один его иммуноконъюгат и/или по меньшей мере один конъюгат анти-CD79b антитело-лекарственное средство согласно изобретению. В некоторых вариантах изобретения, фармацевтический препарат содержит (1) антитело согласно изобретению и/или его иммуноконъюгат и (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах изобретения фармацевтическая композиция содержит (1) антитело согласно изобретению и/или его иммуноконъюгат и, необязательно, (2) по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство. Дополнительными терапевтическими средствами являются, но не ограничиваются ими, средства, описанные ниже. ADC обычно вводят парентерально, то есть путем вливания, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, интратекально и эпидурально.

Терапевтические композиции, содержащие анти-CD79b антитело или иммуноконъюгат с CD79b, используемые в соответствии с настоящим изобретением, получают в удобных для хранения формах путем смешивания антитела или иммуноконъюгата, имеющего нужную степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), с получением лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы в используемых дозах и концентрациях должны быть нетоксичными для реципиентов, и ими являются буферы, такие как ацетат, трис, фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенолоспирт, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (имеющие примерно менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как

глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; агенты, придающие тоничность, такие как трегалоза и хлорид натрия; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твинTM, плуроникTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, обычно должны быть стерильными. Это может быть легко достигнуто путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Описанные здесь композиции могут также содержать несколько активных соединений, необходимых для конкретного показания, а предпочтительно имеющих дополнительные активности, не оказывающие негативного влияния друг на друга. Так, например, помимо анти-CD79b антитела, в одну композицию может оказаться желательным включение дополнительного антитела, например, «второго» анти-CD79b антитела, которое связывается с другим эпитопом конкретной раковой опухоли. Альтернативно или дополнительно указанная композиция может также содержать химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, цитокин, рост-ингибирующий агент, антигормональный агент, кардиопротективное средство. Такие молекулы могут присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для применения в нужных целях.

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулу, полученную, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозную или желатиновую микрокапсулу и полиметилметакрилатную микрокапсулу, соответственно, в системы для доставки коллоидальных лекарственных средств (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такая методика описана в руководстве *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть получены препараты пролонгированного высвобождения. Подходящими примерами препаратов пролонгированного высвобождения являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих иммуноглобулин согласно изобретению, где указанные матрицы имеют форму готовых изделий, например, пленок или микрокапсул. Примерами матриц пролонгированного высвобождения являются полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый сополимер этилена-винилацетата, разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTTM (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. Полимеры, такие как сополимер этилена-винилацетата и сополимер молочной кислоты-гликолевой кислоты, способны высвобождать молекулы в течение более 100 дней, а некоторые гидрогели высвобождают белки за более короткие периоды времени. Если инкапсулированные иммуноглобулины сохраняются в организме в течение длительного периода времени, то они могут денатурироваться или агрегироваться под воздействием влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и к возможным изменениям иммуногенности. Для стабилизации, в зависимости от конкретного

механизма, могут быть разработаны рациональные стратегии. Так, например, если было обнаружено, что механизмом агрегации является образование межмолекулярной S-S-связи посредством тио-дисульфидного обмена, то стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислотных растворов, регуляции содержания влаги с использованием соответствующих добавок, и получения конкретных композиций на основе полимерной матрицы.

Антитело может быть получено в любой подходящей форме для доставки в нужные клетки/ткани. Так, например, антитела могут быть приготовлены в виде иммунолипосом. «Липосома» представляет собой небольшую везикулу, состоящую из липидов различных типов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые могут быть использованы для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно расположены так, что они образуют бислой, аналогичный липидному бислою в биологических мембранах. Липосомы, содержащие антитело, получают методами, известными специалистам, такими как методы, описанные в публикации Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); в патентах 4485045 и 4544545; и в заявке WO97/38731, опубликованной 23 октября 1997 г. Липосомы с увеличенным временем полужизни в кровотоке описаны в патенте США № 5013556.

Конкретно используемые липосомы, в состав которых входят такие липиды, как фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-derivатизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭ), могут быть получены методом выпаривания с обратной фазой. Липосомы подвергают экструзии через фильтры с определенным размером пор, в результате чего получают липосомы нужного диаметра. Fab'-фрагменты антитела согласно изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано в публикации Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982), в результате проведения реакции дисульфидного обмена. Липосома может содержать, но необязательно, химиотерапевтическое средство. См. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

Фармацевтические композиции, используемые для введения in vivo, обычно должны быть стерильными. Это может быть легко достигнуто путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Н. Лечение анти-CD79b антителами

Для определения экспрессии CD79b при раковом заболевании могут быть проведены различные детектирующие анализы. В одном из вариантов изобретения сверхэкспрессия полипептида CD79b может быть оценена с помощью иммуногистохимического анализа (ИНС). Залитые в парафин срезы ткани, полученные при биопсии опухоли, могут быть подвергнуты ИНС-анализу и оценены по интенсивности окраски белка CD79b в соответствии с нижеследующими критериями:

Оценка 0 - окрашивание отсутствует или наблюдается окрашивание мембраны у менее чем 10% опухолевых клеток.

Оценка 1+ - очень слабое/едва заметное окрашивание мембраны, детектируемое у более чем 10% опухолевых клеток. При этом указанные клетки окрашены только в части своей мембраны.

Оценка 2+ - слабое или умеренное окрашивание всей мембраны, наблюдаемое у более чем 10% опухолевых клеток.

Оценка 3+ - умеренное или сильное окрашивание всей мембраны, наблюдаемое у более чем 10% опухолевых клеток.

Опухоли, проанализированные на сверхэкспрессию CD79b и получившие оценки 0 или 1+, могут быть охарактеризованы как опухоли, в которых не наблюдается

сверхэкспрессия CD79b, а опухоли с оценками 2+ или 3+ могут быть охарактеризованы как опухоли, сверхэкспрессирующие CD79b.

Альтернативно или дополнительно анализы FISH, такие как INFORMTM (разработанные Ventana Co., Arizona) или PATHVISIONTM (Vysis, Illinois), могут быть осуществлены на фиксированных формалином и залитых в парафин опухолевых тканях для определения уровня сверхэкспрессии CD79b (если она присутствует) в опухоли.

Сверхэкспрессия или амплификация CD79b может быть оценена с помощью детектирующего анализа *in vivo*, например, путем введения молекулы (такой как антитело), которая связывается с детектируемой молекулой; мечения детектируемой меткой (например, радиоактивным изотопом или флуоресцентной меткой) и наружного сканирования пациента для определения локализации метки.

Как было описано выше, анти-CD79b антитела согласно изобретению, помимо терапевтического применения, могут быть использованы и в других различных целях. Анти-CD79b антитела согласно изобретению могут быть использованы для определения стадии развития раковой опухоли, экспрессирующей полипептид CD79b (например, при радиоактивной визуализации). Эти антитела могут быть также использованы для очистки или иммунопреципитации полипептида CD79b из клеток, для детекции и количественной оценки полипептида CD79b *in vitro*, например, в ELISA-анализе или в вестерн-блот-анализе, в целях уничтожения и элиминации CD79b-экспрессирующих клеток из популяции смешанных клеток, как в стадии очистки других клеток.

В настоящее время, в зависимости от стадии развития рака, лечение рака включает проведение нижеследующей терапии отдельно или в комбинации друг с другом, а именно хирургической операции по удалению раковой ткани, лучевой терапии и химиотерапии. Лечение анти-CD79b антителом может быть особенно желательным для пожилых пациентов, которые плохо переносят токсическое и побочное действие химиотерапии, и при метастазах, когда лучевая терапия имеет ограниченное применение.

Противоопухолевые анти-CD79b антитела согласно изобретению могут быть использованы для подавления роста CD79b-экспрессирующей раковой опухоли после первоначального установления диагноза заболевания или во время рецидива заболевания. В терапевтических целях анти-CD79b антитело может быть использовано отдельно или в комбинированной терапии, например, вместе с гормональной терапией, антиангиогенной терапией или терапией с использованием радиоактивно меченных соединений, или вместе с хирургическим вмешательством, криотерапией и/или лучевой терапией. Лечение анти-CD79b антителом может быть осуществлено в комбинации с другими формами стандартной терапии, либо одновременно со стандартной терапией, либо до или после проведения такой терапии. При лечении рака, а в частности, у пациентов с высоким риском развития данного заболевания, используются такие химиотерапевтические средства, как TAXOTERE® (доцетаксел), TAXOL® (паклитаксел), эстрамустин и митоксантрон. В способе согласно изобретению, применяемом для лечения или ослабления симптомов рака, пациенту с раком может быть введено анти-CD79b антитело в комбинации с введением одного или нескольких вышеуказанных химиотерапевтических средств. В частности, рассматривается также комбинированная терапия, осуществляемая вместе с введением паклитаксела и его модифицированных производных (см., например, EP0600517). Анти-CD79b антитело вводят вместе с терапевтически эффективной дозой химиотерапевтического средства. В другом варианте изобретения анти-CD79b антитело вводят в комбинации с химиотерапией для повышения активности и эффективности химиотерапевтического средства, например, паклитаксела. В справочном руководстве для врачей (PDR) указаны дозы средств, которые были

использованы для лечения различных раковых заболеваний. Схемы лечения и введения доз вышеупомянутых химиотерапевтических лекарственных средств, которые являются терапевтически эффективными, зависят от конкретного ракового заболевания, подвергаемого лечению, степени развития данного заболевания и других факторов, которые известны специалисту в данной области и которые могут быть определены лечащим врачом.

В одном из конкретных вариантов изобретения пациенту вводят конъюгат, содержащий анти-CD79b антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством. Предпочтительно иммуноконъюгат, связанный с белком CD79b, интернализуется в клетке, что приводит к повышению терапевтической эффективности иммуноконъюгата в отношении уничтожения раковых клеток, с которыми они связываются. В предпочтительном варианте изобретения цитотоксическое средство нацелено на нуклеиновую кислоту раковых клеток или ингибирует ее действие. Примеры таких цитотоксических средств описаны выше, и такими средствами являются майтанзиноиды, калихеамицины, рибонуклеазы и ДНК-эндонуклеазы.

Анти-CD79b антитела или их конъюгаты с токсинами вводят человеку в соответствии с известными методами, такими как внутривенное введение, например, в виде ударной дозы или путем непрерывного вливания в течение определенного периода времени, а также внутримышечно, внутривентриально, вовнутрь цереброспинальной жидкости, подкожно, внутрисуставно, вовнутрь синовиальной жидкости, интратекально, перорально, местно или путем ингаляции. Предпочтительным является внутривенное или подкожное введение антитела.

Другие курсы терапии могут быть объединены с введением анти-CD79b антитела. Комбинированное введение включает совместное введение отдельных препаратов или одного фармацевтического препарата и их последовательное введение в любом порядке, предпочтительно в течение периода времени, за который оба (или все) активных агента одновременно проявляют свою биологическую активность. При этом предпочтительно, чтобы такая комбинированная терапия давала синергический терапевтический эффект.

Может также оказаться желательным проведение комбинированного введения анти-CD79b антитела или антител вместе с введением антитела против другого опухолевого антигена, ассоциированного с конкретным раковым заболеванием.

В другом варианте изобретения способы терапевтического лечения согласно изобретению включают комбинированное введение анти-CD79b антитела (или антител) и одного или нескольких химиотерапевтических средств или рост-ингибирующих средств, включая совместное введение смеси из различных химиотерапевтических средств или другого(их) химиотерапевтического(их) средства (средств) или другого(их) терапевтического(их) средства (средств), которые также ингибируют рост опухоли. Химиотерапевтическими средствами являются фосфат эстрамустина, преднимустин, цисплатин, 5-фторурацил, мелфалан, циклофосфамид, гидроксимочевина и гидроксимочевинные таксаны (такие как паклитаксел и доцетаксел) и/или антрациклиновые антибиотики. Способы получения и схемы введения таких химиотерапевтических средств могут быть проведены в соответствии с инструкциями производителей, либо они могут быть эмпирически подобраны самим специалистом. Способы получения и схемы введения химиотерапевтических средств также описаны в публикации "Chemotherapy Service", Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md (1992). Антитело может быть объединено с противогормональным соединением, например, антиэстрогенным соединением, таким как тамоксифен; антипрогестероновым соединением, таким как онапристон (см. EP 616812) или антиандрогеновым соединением,

таким как флутамид, в дозах, обычно применяемых для введения таких молекул. Если раком, подвергаемым лечению, является андроген-зависимый рак, то пациент может быть предварительно подвергнут антиандрогенной терапии, а затем, после того как рак станет андроген-независимым, пациенту может быть введено анти-CD79b антитело (и необязательно другие описанные здесь средства).

Иногда может также оказаться желательным совместное введение пациенту средства для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний (для предупреждения или снижения нарушения функции миокарда, ассоциированного с данной терапией) или одного или нескольких цитокинов. Помимо вышеуказанных терапевтических схем лечения, пациент может быть подвергнут хирургической операции по удалению раковых клеток, и/или он может быть подвергнут лучевой терапии (например, наружному облучению или терапии с использованием радиоактивно меченого агента, такого как антитело), проводимой до, во время или после терапии антителом. Подходящими дозами для любых из вышеуказанных совместно вводимых средств являются используемые здесь дозы, и эти дозы могут быть снижены благодаря комбинированному (синергическому) действию указанного средства и анти-CD79b антитела.

Антитело-содержащую композицию согласно изобретению приготавливают, разделяют на дозы и вводят в соответствии с хорошо известной медицинской практикой. Факторами, учитываемыми для приготовления таких композиций, являются конкретное расстройство, подвергаемое лечению, конкретное млекопитающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние конкретного пациента, этиологический фактор, вызывающий данное расстройство, участок, на который направлено данное средство, способ введения, схема введения и другие факторы, известные практическим врачам. Указанное антитело должно быть, но необязательно, приготовлено в виде композиции с одним или несколькими современными средствами, используемыми для предупреждения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антитела согласно изобретению, присутствующего в данной композиции, типа расстройства или способа его лечения и от других факторов, обсуждаемых выше. Указанные другие средства обычно вводятся в тех же самых дозах и теми же способами, которые обычно использовались ранее, либо эти дозы составляют примерно 1-99% от используемых ранее доз.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящие дозы и схемы введения лекарственного средства могут быть выбраны врачом в соответствии с известными критериями. Соответствующие дозы антитела зависят от типа заболевания, подвергаемого лечению, как определено выше, тяжести и курса лечения заболевания, независимо от того, вводят ли указанное антитело в профилактических или терапевтических целях, от проводимого ранее лечения, от истории болезни пациента и его восприимчивости к данному антителу, и от назначения лечащего врача. Такое антитело может быть введено пациенту один раз или несколько раз во время проведения курса лечения. Предпочтительно антитело вводят путем внутривенной инъекции или подкожной инъекции. В зависимости от типа и тяжести заболевания, начальная предварительно установленная доза антитела, вводимого пациенту, составляет примерно от 1 мкг/кг до 50 мг/кг массы тела (например, примерно 0,1-15 мг/кг/дозу), независимо от того, осуществляют ли одноразовое или многократное введение или непрерывную инфузию данного антитела. Схема введения дозы может включать введение первоначальной нагрузочной дозы анти-CD79b антитела, составляющей примерно 4 мг/кг, с последующим еженедельным введением поддерживающей дозы, составляющей примерно 2 мг/кг анти-CD79b антитела. Однако могут быть проведены и другие схемы

введения доз. Типичная суточная доза может составлять примерно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. Для повторного введения в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение может проводиться до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое подавление симптомов заболевания. Мониторинг эффекта такой терапии может быть легко проведен стандартными методами, с помощью анализов и в соответствии с критериями, известными врачу или другим специалистам в данной области.

В настоящей заявке, помимо введения белка-антитела пациенту, рассматривается также введение антитела методом генотерапии. Такое введение нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, входит в объем термина «введение терапевтически эффективного количества антитела». См., например, заявку WO96/07321, опубликованную 14 марта 1996 г., и относящуюся к применению генотерапии для продуцирования внутриклеточных антител.

Существует два основных способа введения нуклеиновой кислоты (необязательно содержащейся в векторе) в клетки пациента, *in vivo* и *ex vivo*. Для *in vivo* доставки нуклеиновую кислоту непосредственно вводят пациенту, а обычно на участок, на который требуется введение антитела. Для лечения *ex vivo* делают забор клеток пациента, а затем в эти выделенные клетки вводят нуклеиновую кислоту, и модифицированные клетки вводят пациенту либо непосредственно, либо, например, в виде капсул в пористых мембранах, которые имплантируют пациенту (см., например, патенты США 4892538 и 5283187). Существует ряд методов введения нуклеиновых кислот в жизнеспособные клетки. Такие методы могут варьироваться в зависимости от того, вводят ли нуклеиновую кислоту в клетки, культивированные *in vitro*, или ее вводят *in vivo* в клетки представляющего интерес хозяина. Методами, подходящими для переноса нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих *in vitro*, являются методы с применением липосом, электропорация, микроинъекция, слияние клеток, метод с применением DEAE-декстрана, метод преципитации фосфатом кальция и т.п. Наиболее часто используемым вектором для доставки гена *ex vivo* является ретровирусный вектор.

В настоящее время предпочтительными методами переноса нуклеиновой кислоты *in vivo* являются трансфекция вирусными векторами (такими как аденовирус, вирус простого герпеса I или аденоассоциированный вирус) и липидные системы (подходящими липидами для липид-опосредуемого переноса гена являются, например, DOTMA, DOPE и DC-Chol). Описание используемых в настоящее время протоколов мечения генов и генотерапии можно найти в публикации Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992). См. также заявку WO 93/25673 и цитируемые в ней работы.

В объем употребляемого здесь термина «антитело» могут входить различные формы анти-CD79b антител согласно изобретению. Таким образом, указанными антителами являются полноразмерное или интактное антитело, фрагменты антитела, антитело с нативной последовательностью или его аминокислотные варианты, гуманизированные, химерные или гибридные антитела, иммуноконъюгаты и их функциональные фрагменты. В гибридных антителах последовательность антитела присоединена к гетерологичной полипептидной последовательности. Антитела могут быть модифицированы в Fc-области для сообщения нужных эффекторных функций. Как обсуждалось более подробно в представленных здесь разделах, посвященных соответствующим Fc-областям, «оголенное» антитело, связанное с клеточной поверхностью, может индуцировать цитотоксичность, например, благодаря антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или рекрутинга комплемента в случае комплемент-зависимой цитотоксичности или по некоторым другим механизмам. Альтернативно, если

желательно элиминировать или ослабить эффекторную функцию, в целях минимизации побочных эффектов или осложнений при терапии, могут быть использованы некоторые другие Fc-области.

В одном из вариантов изобретения антитело конкурирует за связывание или по существу связывается с тем же эпитопом, с которым связываются антитела согласно изобретению. Также рассматриваются антитела, обладающие биологическими свойствами анти-CD79b антител согласно изобретению, а в частности, включая доставку в опухоль *in vivo* и любое ингибирование пролиферации клеток, или цитотоксическими свойствами.

Методы продуцирования вышеуказанных антител подробно описаны в настоящей заявке.

Анти-CD79b антитела согласно изобретению могут быть использованы для лечения CD79b-экспрессирующих раковых опухолей или ослабления одного или нескольких симптомов рака у млекопитающего. Такими раковыми заболеваниями являются, но не ограничиваются ими, рак гемопозитической системы или рак крови, такой как лимфома, лейкоз, миелома или лимфоидные злокачественные опухоли, а также рак селезенки и рак лимфоузлов. Более конкретными примерами таких В-клеточно-ассоциированных раковых заболеваний являются, например, высокозлокачественная, среднелзлокачественная и низкостлокачественная лимфома (включая В-клеточные лимфомы, такие как, например, В-клеточная лимфома лимфоидной ткани слизистой, и неходжкинская лимфома, лимфома клеток коры головного мозга, лимфома Беркитта, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лимфома маргинальной зоны, диффузная крупноклеточная лимфома, фолликулярная лимфома, ходжкинская лимфома, и Т-клеточные лимфомы) и лейкоз (включая вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, такой как В-клеточный лейкоз (CD5⁺-В-лимфоциты), миелоидный лейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоидный лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз и миелодисплазия) и другие гематологические и/или В-клеточные или Т-клеточные раковые опухоли. Термин «рак» включает метастазы любого из вышеупомянутых заболеваний. Указанное антитело обладает способностью связываться по меньшей мере с частью раковых клеток, экспрессирующих полипептид CD79b у млекопитающего. В предпочтительном варианте изобретения указанное антитело является эффективным для разрушения или уничтожения CD79b-экспрессирующих опухолевых клеток, или ингибирования роста таких опухолевых клеток *in vitro* или *in vivo* после связывания указанного антитела с полипептидом CD79b на клетках. Таким антителом является «оголенное» анти-CD79b антитело (не конъюгированное с каким-либо агентом). «Оголенные» антитела, которые обладают цитотоксическими свойствами или свойствами, направленными на ингибирование роста клеток, могут быть также присоединены к цитотоксическому средству, что делает их еще более эффективными в отношении деструкции опухолевых клеток. Цитотоксические свойства могут быть сообщены анти-CD79b антителу, например, путем конъюгирования указанного антитела с цитотоксическим средством, с образованием описанного здесь иммуноконъюгата. Такое цитотоксическое средство или рост-ингибирующее средство предпочтительно являются низкомолекулярными. Предпочтительными также являются токсины, такие как калихеамицин или майтанзиноид и его аналоги или производные.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей анти-CD79b антитело согласно изобретению и носитель. Для лечения рака композиции могут быть введены пациенту, нуждающемуся в таком лечении, где указанная композиция может содержать одно или несколько анти-CD79b антител, присутствующих в виде иммуноконъюгата

или в виде «оголенного» антитела. В другом варианте изобретения указанные композиции могут содержать эти антитела в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как цитотоксические средства или рост-ингибирующие средства, включая химиотерапевтические средства. Настоящее изобретение также относится к

5 препаратам, содержащим анти-CD79b антитело согласно изобретению и носитель. В одном из вариантов антитела указанным препаратом является терапевтический препарат, содержащий фармацевтически приемлемый носитель.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим анти-CD79b антитела. Этот термин также охватывает

10 нуклеиновые кислоты, кодирующие цепи H и L, а в частности остатки гипервариабельной области; цепи нуклеиновых кислот, кодирующие антитело с нативной последовательностью, а также их варианты, модификации и гуманизированные варианты антитела.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения раковой опухоли,

15 экспрессирующей полипептид CD79b, или к ослаблению одного или нескольких симптомов рака у млекопитающего, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества анти-CD79b антитела млекопитающему. Антитело-содержащие терапевтические композиции могут быть введены в течение непродолжительного периода времени (однократное введение) или в течение

20 длительного периода времени, либо периодически, в зависимости от назначения врача. Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования роста клеток, экспрессирующих полипептид CD79b, и цитолиза этих клеток.

Настоящее изобретение также относится к наборам и промышленным изделиям, содержащим по меньшей мере одно анти-CD79b антитело. Наборы, содержащие анти-

25 CD79b антитела, могут быть использованы, например, для анализа на цитолиз CD79b-клеток, а также для очистки или иммунопреципитации полипептида CD79b из клеток. Так, например, для выделения и очистки CD79b указанный набор может содержать анти-CD79b антитело, связанное со сферами (например, сефарозными сферами). Могут быть получены наборы, которые содержат антитела для детекции и количественной

30 оценки CD79b in vitro, например, с помощью ELISA или вестерн-блот-анализа. Антитело, используемое для детекции, может быть связано с меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка.

I. Лечение конъюгатом “антитело-лекарственное средство”

Предполагается, что конъюгаты “антитело-лекарственное средство” (ADC) согласно

35 изобретению могут быть использованы для лечения различных заболеваний или расстройств, характеризующихся, например, сверхэкспрессией опухолевого антигена. Репрезентативными состояниями или гиперпролиферативными расстройствами являются доброкачественные или злокачественные опухоли; лейкоз и лимфоидные злокачественные заболевания. Другими заболеваниями являются расстройства,

40 ассоциированные с нарушением функций нервных клеток, глиальных клеток, гипоталамуса, железистых клеток, макрофагов, клеток эпителия, стромы и бластоцеля, а также воспалительные, ангиогенные и иммунологические расстройства, включая аутоиммунные расстройства.

ADC-соединения, которые были идентифицированы у животных-моделей и в

45 клеточных анализах, могут быть дополнительно протестированы у высших приматов, имеющих опухоли, и в клинических испытаниях с участием человека. Клинические испытания с участием человека могут быть разработаны в целях определения эффективности моноклонального анти-CD79b антитела или иммуноконъюгата согласно

изобретению у пациентов, страдающих В-клеточно-пролиферативным расстройством, включая, но не ограничиваясь ими, лимфому, неходжкинскую лимфому (НХЛ), агрессивную НХЛ, рецидивирующую агрессивную НХЛ, рецидивирующую бессимптомную НХЛ, не поддающуюся лечению НХЛ, не поддающуюся лечению 5 бессимптомную НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфому клеток коры головного мозга. Клинические испытания могут быть разработаны для оценки эффективности ADC в комбинации с известными терапевтическими схемами лечения, такими как лучевая терапия и/или химиотерапия 10 с использованием известных химиотерапевтических и/или цитотоксических средств.

В общих чертах, заболеванием или расстройством, поддаваемым лечению, является гиперпролиферативное заболевание, такое В-клеточно-пролиферативное расстройство и/или В-клеточный рак. Примерами раковых заболеваний, поддаваемых лечению, являются, но не ограничиваются ими, В-клеточно-пролиферативное расстройство, 15 выбранное из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной НХЛ, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) 20 и лимфомы клеток коры головного мозга.

Раковая опухоль может включать CD79b-экспрессирующие клетки, с которыми может связываться ADC согласно изобретению. Для определения уровней экспрессии CD79b в раковой опухоли могут быть проведены различные диагностические/прогностические анализы. В одном из вариантов изобретения уровень сверхэкспрессии 25 CD79b может быть проанализирован с помощью ИНС. Залитые в парафин срезы тканей, взятых путем биопсии опухоли, могут быть подвергнуты ИНС-анализу и оценены на степень окрашивания и количество опухолевых клеток в соответствии со следующими критериями оценки интенсивности окрашивания белка CD79b.

Для предупреждения или лечения заболевания выбор соответствующей дозы ADC 30 зависит от типа поддаваемого лечению заболевания, указанного выше, тяжести и течения этого заболевания, от типа молекулы, вводимой в профилактических или терапевтических целях, от проводимой ранее терапии, от истории болезни пациента и его восприимчивости к данному антителу, а также от назначения лечащего врача. Указанную молекулу соответствующим образом вводят пациенту за один курс или в 35 течение нескольких курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания, начальная доза молекулы, назначенной для введения пациенту, составляет примерно 1-15 мкг/кг (например, 0,1-20 мг/кг), и эта доза может быть введена в виде разовой дозы или дробных доз, либо она может быть введена путем непрерывного вливания. Типичная суточная доза может составлять примерно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в 40 зависимости от вышеупомянутых факторов. Репрезентативная доза ADC, вводимая пациенту, составляет примерно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела пациента.

Для повторного введения в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния пациента, лечение может быть продолжено до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое ослабление симптомов заболевания. Репрезентативная схема 45 введения доз включает введение начальной ударной дозы примерно 4 мг/кг, а затем еженедельное введение поддерживающей дозы анти-ErbB2 антитела, составляющей примерно 2 мг/кг. При этом могут быть применены и другие схемы введения доз. Эффект такой терапии может быть легко прослежен с применением стандартных методов и

анализов.

J. Комбинированная терапия

Конъюгат «антитело-лекарственное средство» (ADC) согласно изобретению может быть объединен со вторым соединением, обладающим противораковыми свойствами, с получением комбинированной фармацевтической композиции, либо он может быть применен вместе с другими курсами лечения в виде комбинированной терапии.

Указанное второе соединение такой фармацевтической комбинированной композиции или комбинированного курса лечения обеспечивает дополнительную активность комбинации ADC, при условии, что компоненты такой комбинированной комбинации не оказывают негативного воздействия друг на друга.

Таким вторым соединением может быть химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, цитокин, средство, ингибирующее рост клеток, противогормональное средство и/или средство для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Указанные молекулы обычно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для достижения данной цели. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC согласно изобретению, может также содержать терапевтически эффективное количество химиотерапевтического средства, такого как ингибитор образования тубулина, ингибитор топоизомеразы или ДНК-связывающий агент.

В одном из аспектов изобретения первым соединением является анти-CD79b ADC согласно изобретению, а вторым соединением является анти-CD20 антитело (либо «оголенное» антитело, либо ADC). В одном из вариантов изобретения вторым соединением является анти-CD20 антитело (ритуксимаб, Rituxan®) или 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Другими антителами, используемыми в комбинированной иммунотерапии с анти-CD79b ADC согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, анти-VEGF антитело (например, Avastin®).

Другие курсы терапии могут быть объединены с применением другой противораковой терапии согласно изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, лучевую терапию и/или трансплантацию костного мозга и клеток периферической крови, и/или введение цитотоксического средства, химиотерапевтического средства или рост-ингибирующего агента. В одном из таких вариантов химиотерапевтическим средством является средство или комбинация средств, таких как, например, циклофосфамид, гидроксидаунорубин, адриамицин, доксорубин, винкристин (Oncovin™), преднизолон, CHOP, CVP или COP, или иммунотерапевтические средства, такие как анти-CD20 антитело (например, Rituxan®) или анти-VEGF антитело (например, Avastin®).

Комбинированная терапия может быть осуществлена путем одновременного или последовательного проведения отдельных курсов лечения. При последовательном режиме проведения таких курсов, указанная комбинация лекарственных средств может быть введена в два этапа или в несколько этапов. Такая комбинированная терапия включает совместное введение отдельных препаратов или их введение в виде одного фармацевтического препарата, и последовательное их введение в любом порядке, предпочтительно в течение периода времени, за который оба (или все) активных агента одновременно проявляют свою биологическую активность.

В одном из вариантов изобретения лечение с использованием ADC включает комбинированное введение идентифицированного здесь противоракового средства и одного или нескольких химиотерапевтических средств или ингибиторов роста, включая совместное введение смеси из различных химиотерапевтических средств.

Химиотерапевтическими средствами являются таксаны (такие как паклитаксел и

доцетаксел) и/или антрациклиновые антибиотики. Способы получения и схемы введения таких химиотерапевтических средств могут быть проведены в соответствии с инструкциями производителя, либо они могут эмпирически подобраны специалистом. Способы получения и схемы введения доз химиотерапевтических средств также описаны в публикации "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Подходящими дозами для любых из вышеуказанных совместно вводимых средств являются используемые здесь дозы, и эти дозы могут быть снижены благодаря комбинированному (синергическому) действию только что идентифицированного средства и других химиотерапевтических средств или курсов лечения.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и "синергическое действие" активных ингредиентов, то есть, когда эффект, достигаемый в случае совместного использования активных ингредиентов, превышает сумму эффектов, достигаемых при отдельном использовании данных соединений. Синергический эффект может достигаться в том случае, если активные ингредиенты (1) приготовлены в смеси друг с другом и введены или доставлены одновременно в виде комбинированной унифицированной лекарственной формы; (2) доставлены путем поочередного или параллельного введения в виде отдельных препаратов; или (3) доставлены в соответствии с некоторыми другими схемами введения. При введении посредством альтернативной терапии синергический эффект может быть достигнут в том случае, если указанное соединение вводят или доставляют последовательно, например, путем различных инъекций в отдельных шприцах. В общих чертах, во время альтернативной терапии эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть поочередно, а во время комбинированной терапии эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят совместно.

К. Промышленные изделия и наборы

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к промышленному изделию, содержащему материалы, используемые для лечения, предупреждения и/или диагностики CD79b-экспрессирующей раковой опухоли. Такое промышленное изделие содержит упаковку, а также этикетку, наклеенную на эту упаковку, или вкладыш, вложенный в такую упаковку. Подходящими упаковками являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.п. Такие упаковки могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Указанная упаковка содержит композицию, которая является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностики ракового заболевания, и может иметь стерильное входное отверстие (например, такой упаковкой может быть пакет для внутривенного введения раствора или сосуд, имеющий пробку, протыкаемую иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одним активным агентом в указанной композиции является анти-CD79b антитело согласно изобретению. На этикетке или во вкладыше, вложенном в упаковку, должно быть указано, что такая композиция используется для лечения рака. Этикетка или вкладыш в упаковку может также содержать инструкции по введению композиции антитела пациенту, страдающему раковым заболеванием. Альтернативно указанное промышленное изделие может также включать вторую упаковку, содержащую фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, такое изделие может также включать и другие материалы, необходимые с точки зрения промышленного производства и потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Настоящее изобретение также относится к наборам, которые могут быть использованы в различных целях, например, для анализов на цитолиз CD79b-экспрессирующих клеток, для очистки или иммунопреципитации полипептида CD79b из клеток. Для выделения и очистки полипептида CD79b набор может содержать анти-CD79b антитело, связанное со сферами (например, с сефарозными сферами). Могут быть получены наборы, которые содержат антитела для детекции и количественной оценки полипептида CD79b *in vitro*, например, в ELISA-анализе или в вестерн-блот-анализе. Указанный набор, как и промышленное изделие, содержит упаковку, а также этикетку, наклеенную на эту упаковку, или вкладыш, вложенный в такую упаковку. Эта упаковка содержит композицию, включающую по меньшей мере одно анти-CD79b антитело согласно изобретению. Могут быть также включены и другие упаковки, которые содержат, например, разбавители, буферы и контрольные антитела. Этикетка или вкладыш в упаковку могут содержать описание композиции, а также инструкции по применению *in vitro* или детекцию.

L. Применение полипептидов CD79b

Настоящее изобретение охватывает способы скрининга соединений для идентификации соединений, имитирующих полипептид CD79b (агонисты), или предотвращения действия полипептида CD79b (антагонисты). Скрининг-анализы для выявления кандидатов-антагонистов, используемых в качестве лекарственных средств, были разработаны для идентификации соединений, которые связываются или образуют комплекс с полипептидами CD79b, кодируемыми идентифицированными здесь генами, или, наоборот, препятствуют взаимодействию кодируемых полипептидов с другими клеточными белками, включая, например, ингибирование экспрессии полипептида CD79b из клеток. Такие скрининг-анализы включают анализы, подходящие для крупномасштабного скрининга химических библиотек, а поэтому подходящими для идентификации небольших молекул-кандидатов на лекарственные средства.

Анализы могут быть разработаны в различных форматах, включая анализы на связывание белок-белок, биохимические скрининг-анализы, иммуноанализы и клеточные анализы, хорошо известные специалистам.

Все анализы на антагонисты являются стандартными, то есть для их осуществления требуется контактирование лекарственного средства-кандидата с полипептидом CD79b, кодируемым нуклеиновой кислотой, идентифицированной здесь в условиях и в течение периода времени, достаточного для взаимодействия этих двух компонентов.

В анализах на связывание указанным взаимодействием является связывание, и образованный комплекс может быть выделен из реакционной смеси или детектирован в этой смеси. В конкретном варианте изобретения полипептид CD79b, кодируемый идентифицированным здесь геном, или лекарственное средство-кандидат иммобилизуют на твердой фазе, например, на микротитрационном планшете, посредством ковалентного или нековалентного связывания. Нековалентное связывание обычно осуществляют путем нанесения на твердую поверхность раствора полипептида CD79b и сушки. Альтернативно иммобилизованное антитело, например, моноклональное антитело, специфичное к иммобилизованному полипептиду CD79b, может быть использовано для заякоривания на твердой поверхности. Такой анализ осуществляют путем добавления неиммобилизованного компонента, который может быть помечен детектируемой меткой, на иммобилизованный компонент, например, на поверхность с покрытием, содержащим заякоренный компонент. Если реакция осуществляется полностью, то непрореагировавшие компоненты удаляют, например, путем промывки, а затем детектируют комплексы, заякоренные на твердой поверхности. Если

первоначально неиммобилизованный компонент несет детектируемую метку, то детекция метки, иммобилизованной на поверхности, свидетельствует об образовании комплекса. Если первоначально неиммобилизованный компонент не несет детектируемую метку, то образование комплекса может быть детектировано, например, с использованием меченого антитела, специфически связывающегося с иммобилизованным комплексом.

Если соединение-кандидат взаимодействует, но не связывается с конкретным полипептидом CD79b, кодируемым идентифицированным здесь геном, то его взаимодействие с полипептидом может быть проанализировано методами, хорошо известными как методы детекции взаимодействий «белок-белок».

Такие анализы предусматривают применение традиционных методов, таких как например, перекрестное связывание, ко-иммунопреципитация и совместная очистка в градиенте или на хроматографических колонках. Кроме того, мониторинг взаимодействия «белок-белок» может быть осуществлен с использованием дрожжевой генетической системы, описанной Fields и сотрудниками (Fields and Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) и Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991). Многие активаторы транскрипции, такие как дрожжевой GAL4, состоят из двух физически дискретных модульных доменов, один из которых действует как ДНК-связывающий домен, а другой действует как домен активации транскрипции. Экспрессионная дрожжевая система, описанная в вышеуказанных публикациях (в основном, называемая «двухкомпонентной гибридной системой»), имеет то преимущество, что в ней используется гибрид из двух белков, один из которых представляет собой белок-мишень, связанный с ДНК-связывающимся доменом GAL4, а другой представляет собой активирующий белок-кандидат, связанный с активирующим доменом. Экспрессия гена-репортера GAL1-lacZ под контролем GAL4-активированного промотора зависит от восстановления активности GAL4 посредством взаимодействия «белок-белок». Колонии, содержащие взаимодействующие полипептиды, детектируют с использованием хромогенного субстрата для β -галактозидазы. Полный набор (MATCHMAKERTM) для идентификации «белок-белок»-взаимодействий между двумя специфическими белками, осуществляемых методами с применением двухкомпонентных гибридов, является коммерчески доступным и поставляется фирмой Clontech. Эта система может быть также использована для картирования доменов белка, участвующих в специфических белковых взаимодействиях, а также для точного определения аминокислотных остатков, играющих важную роль в таких взаимодействиях.

Соединения, которые ингибируют взаимодействие гена, кодирующего идентифицированный здесь полипептид CD79b, с другими внутри- или внеклеточными компонентами, могут быть протестированы следующим образом: обычно получают реакционную смесь, содержащую продукт гена и внутри- и внеклеточного компонента, в определенных условиях и в течение определенного периода времени, достаточного для взаимодействия и связывания двух продуктов. Для анализа способности соединения-кандидата ингибировать связывание, реакцию проводят при отсутствии и в присутствии тестируемого соединения. Кроме того, к третьей реакционной смеси может быть добавлено плацебо, которое служит в качестве позитивного контроля. Мониторинг связывания (образования комплекса) тестируемого соединения с внутри- или внеклеточным компонентом, присутствующим в смеси, проводят, как описано выше. Образование комплекса в контрольной(ых) реакции(ях), но не в реакционной смеси, содержащей тестируемое соединение, указывает на то, что тестируемое соединение препятствует взаимодействию тестируемого соединения с его реакционным партнером.

Для анализа на антагонисты полипептид CD79b может быть добавлен в клетки вместе с соединением, скринируемым на конкретную активность, а способность соединения ингибировать представляющую интерес активность в присутствии полипептида CD79b означает, что указанное соединение является антагонистом полипептида CD79b.

5 Альтернативно антагонисты могут быть детектированы путем объединения полипептида CD79b и потенциального антагониста с мембраносвязанными рецепторами полипептида CD79b или рекомбинантными рецепторами в условиях, подходящих для проведения анализа на конкурентное ингибирование. Полипептид CD79b может быть помечен, например, радиоактивной меткой, в результате чего различные молекулы полипептида
10 CD79b, связанные с рецептором, могут быть использованы для определения эффективности потенциального антагониста. Ген, кодирующий рецептор, может быть идентифицирован различными методами, известными специалистам, например, методами пэннинга лиганда и FACS-сортирования. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991). Если полиаденилированную РНК получают из клетки, восприимчивой к
15 полипептиду CD79b, то предпочтительно осуществляют экспрессионное клонирование, и библиотеку кДНК, созданную из этой РНК, разделяют на пулы и используют для трансфекции клеток COS или других клеток, которые не являются восприимчивыми к полипептиду CD79b. Трансфицированные клетки, выращенные на предметных стеклах, обрабатывают меченым полипептидом CD79b. Полипептид CD79b может быть помечен
20 различными методами, включая йодирование или включение сайта распознавания для сайт-специфической протеинкиназы. После фиксации и инкубирования предметные стекла подвергают автордиографическому анализу. Позитивные пулы идентифицируют, а затем получают субпулы, которые повторно трансфицируют итерационным методом получения субпулов и повторного скрининга, в результате чего получают один клон,
25 кодирующий предполагаемый рецептор.

В альтернативном способе идентификации рецептора меченый полипептид CD79b может быть фотоаффинно связан с клеточной мембраной, либо могут быть получены препараты, экспрессирующие молекулу рецептора. Перекрестно-связанный материал разделяют с помощью электрофореза в ПААГ и экспонируют с рентгеновской пленкой.
30 Меченый комплекс, содержащий рецептор, может быть вырезан, разделен на пептидные фрагменты, и белки подвергают микросеквенированию. Аминокислотная последовательность, полученная после микросеквенирования, может быть использована в целях конструирования набора вырожденных олигонуклеотидных зондов для скрининга библиотеки кДНК, проводимого в целях идентификации гена, кодирующего
35 предполагаемый рецептор.

В другом анализе на антагонисты клетки млекопитающих или мембранный препарат, экспрессирующий данный рецептор, могут быть инкубированы с меченым полипептидом CD79b в присутствии соединения-кандидата. Затем может быть определена способность данного соединения усиливать или блокировать такое взаимодействие.

40 Более конкретными примерами потенциальных антагонистов является олигонуклеотид, который связывается с гибридами иммуноглобулина и полипептида CD79b, а в частности, антитела, включая, но не ограничиваясь ими, поликлональные и моноклональные антитела и их фрагменты, одноцепочечные антитела, антиидиотипические антитела и химерные или гуманизированные варианты таких
45 антител или их фрагментов, а также человеческие антитела и их фрагменты. Альтернативно потенциальным антагонистом может быть близкородственный белок, например, мутированная форма полипептида CD79b, который распознает рецептор, но не оказывает какого-либо действия на него, и тем самым конкурентно ингибирует

действие полипептида CD79b.

Антитела, специфически связывающиеся с идентифицированным здесь полипептидом CD79b, а также другие молекулы, идентифицированные в вышеупомянутых скрининг-анализах, могут быть введены в форме фармацевтических композиций для лечения

5 различных заболеваний, включая рак.

Если полипептид CD79b является внутриклеточным, а в качестве ингибиторов используют целые антитела, то предпочтительными являются интернализирующие антитела. Однако для доставки антитела или фрагмента антитела в клетке, могут быть также использованы липофектанты или липосомы. Если используются фрагменты

10 антител, то предпочтительным является самый короткий ингибирующий фрагмент, который специфически связывается со связывающим доменом белка-мишени. Так, например, исходя из последовательностей варибельной области антитела, могут быть сконструированы пептидные молекулы, которые сохраняют способность связываться с последовательностью белка-мишени. Такие пептиды могут быть синтезированы

15 химическим методом и/или могут быть продуцированы методами рекомбинантных ДНК. См., например, Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7889-7893 (1993).

Описанный здесь препарат может также содержать более чем одно активное соединение, необходимое для лечения конкретного заболевания, а предпочтительно соединение, обладающее комплементарными активностями, которые не оказывают

20 негативного влияния друг на друга. Альтернативно или дополнительно указанная композиция может содержать агент, усиливающий ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтическое средство или рост-ингибирующее средство. Такие молекулы обычно присутствуют в комбинации в количестве, эффективном для достижения нужной цели.

25 М. Производные антител

Антитела согласно изобретению могут быть дополнительно модифицированы так, чтобы они содержали другие небелковые молекулы, которые известны специалистам и являются легко доступными. Предпочтительными молекулами, подходящими для

30 дериватизации антител, являются водорастворимые полимеры. Неограничивающими примерами водорастворимых полимеров являются полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (гомополимеры или статистические сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)

35 полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. При промышленном изготовлении следует отдать предпочтение пропиональдегиду полиэтиленгликоля благодаря его стабильности в воде. Этот полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или

40 неразветвленным. Число полимеров, присоединяемых к антителу, может варьироваться, и если присоединяют более чем один полимер, то эти полимеры могут иметь одинаковые или различные молекулы. В общих чертах, число и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, могут быть выбраны, исходя из нескольких факторов, включая, но не ограничиваясь ими, конкретные свойства или функции антитела, которые должны

45 быть улучшены, независимо от конкретных условий проведения терапии, при которых будет использоваться указанное производное антитела и т.п.

N. Способ скрининга

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к способу определения

присутствия полипептида CD79b в образце, предположительно содержащем полипептид CD79b, где указанный способ включает обработку образца конъюгатом «антитело-лекарственное средство», который связывается с полипептидом CD79b, и определение уровня связывания указанного конъюгата «антитело-лекарственное средство» с полипептидом CD79b в образце, где наличие такого связывания указывает на присутствие полипептида CD79b в образце. Такой образец может, но необязательно, содержать клетки (которые могут быть раковыми клетками), предположительно экспрессирующие полипептид CD79b. Конъюгат «антитело-лекарственное средство», используемый в данном способе, может быть, но необязательно, детектируемо помечен, присоединен к твердому носителю или т.п.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к способу диагностики присутствия опухоли у млекопитающего, где указанный способ включает (а) контактирование тестируемого образца, содержащего клетки ткани, выделенные у млекопитающего, с конъюгатом «антитело-лекарственное средство», который связывается с полипептидом CD79b, и (b) детекцию образования комплекса между конъюгатом «антитело-лекарственное средство» и полипептидом CD79b в тестируемом образце, где образование комплекса указывает на присутствие опухоли у млекопитающего. Конъюгат «антитело-лекарственное средство», используемый в данном способе, может быть, но необязательно, детектируемо помечен, присоединен к твердому носителю или т.п., и/или тестируемый образец клеток ткани может быть получен от индивидуума с подозрением на раковую опухоль.

IV. Другие способы применения анти-CD79b антител и иммуноконъюгатов

A. Диагностические способы и способы детекции

В одном из аспектов изобретения анти-CD79b антитела и иммуноконъюгаты согласно изобретению могут быть использованы для детекции присутствия CD79b в биологическом образце. Используемый здесь термин «детекция» охватывает количественную и качественную детекцию. В некоторых вариантах изобретения биологический образец содержит клетки или ткани. В некоторых вариантах изобретения такими тканями являются нормальные или раковые ткани, которые, по сравнению с другими тканями, экспрессируют CD79b на более высоком уровне, например, В-клетки и/или ткани, ассоциированные с В-клетками.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу детекции присутствия CD79b в биологическом образце. В некоторых вариантах изобретения указанный способ включает контактирование биологического образца с анти-CD79b антителом в условиях, благоприятствующих связыванию анти-CD79b антитела с CD79b, и детекцию образования комплекса между анти-CD79b антителом и CD79b.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу диагностики расстройства, ассоциированного с повышением уровня экспрессии CD79b. В некоторых вариантах изобретения указанный способ включает контактирование тестируемой клетки с анти-CD79b антителом; определение уровня экспрессии (либо количественное, либо качественное) CD79b в тестируемых клетках путем детекции связывания анти-CD79b антитела с CD79b; и сравнение уровней экспрессии CD79b в тестируемых клетках с уровнем экспрессии CD79b в контрольных клетках (например, в нормальных клетках, происходящих от той же ткани, от которой происходят тестируемые клетки, или в клетках, которые по сравнению с нормальными клетками экспрессируют CD79b), где более высокий уровень экспрессии CD79b в тестируемых клетках, по сравнению с контрольными клетками, указывает на наличие заболевания, ассоциированного с повышенным уровнем экспрессии CD79b. В некоторых вариантах изобретения

тестируемые клетки получают от индивидуума с подозрением на расстройство, ассоциированное с повышенным уровнем экспрессии CD79b. В некоторых вариантах изобретения таким расстройством является клеточно-пролиферативное заболевание, такое как рак или опухоль.

5 Репрезентативными клеточно-пролиферативными расстройствами, которые могут быть диагностированы с использованием антитела согласно изобретению, являются В-клеточные расстройства и/или В-клеточно-пролиферативные расстройства, включая, но не ограничиваясь ими, лимфому, неходжкинскую лимфому (НХЛ), агрессивную НХЛ, рецидивирующую агрессивную НХЛ, рецидивирующую бессимптомную НХЛ,
10 не поддающуюся лечению НХЛ, не поддающуюся лечению бессимптомную НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфому клеток коры головного мозга.

В некоторых вариантах изобретения способ диагностики или детекции, такой как
15 способ, описанный выше, включает детекцию связывания анти-CD79b антитела с CD79b, экспрессируемым на поверхности клеток, или в мембранном препарате, выделенном из клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD79b. В некоторых вариантах изобретения указанный способ включает контактирование клеток с анти-CD79b антителом в условиях, благоприятствующих связыванию анти-CD79b антитела с CD79b,
20 и детекцию образования комплекса между анти-CD79b антителом и CD79b на клеточной поверхности. Репрезентативным анализом для детекции связывания анти-CD79b антитела с CD79b, экспрессируемым на поверхности клеток, является «FACS»-анализ.

Для детекции связывания анти-CD79b антитела с CD79b могут быть применены и некоторые другие методы. Такими методами являются, но не ограничиваются ими,
25 анализы на связывание с антигеном, хорошо известные специалистам, такие как вестерн-блот-анализы, радиоиммуноанализы, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), «сэндвич»-иммуноанализы, анализы с применением иммунопреципитации, флуоресцентные иммуноанализы и иммуноанализы с использованием белка А, и иммуногистохимические анализы (ИГХ).

30 В некоторых вариантах изобретения анти-CD79b антитела являются мечеными. Метками являются, но не ограничиваются ими, метки или молекулы, которые могут быть детектированы непосредственно (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также молекулы, такие как ферменты или лиганды, которые детектируют непрямым методом, например,
35 посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия.

Репрезентативными метками являются, но не ограничиваются ими, радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелатные комплексы редкоземельных металлов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил,
40 умбеллиферон, люциферазы, например, люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахарид-оксидазы, например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантин-оксидаза,
45 присоединенные к ферменту, который использует пероксид водорода для окисления красителя-предшественника, такого как ПХ; лактопероксидаза или микропероксидаза; биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

В некоторых вариантах изобретения анти-CD79b антитела иммобилизуют на

нерастворимой матрице. Иммунизация приводит к отделению анти-CD79b антитела от любого CD79b, оставшегося в растворе в свободном состоянии. Такую процедуру обычно осуществляют путем инсолубилизации анти-CD79b антитела перед проведением процедуры анализа, как это происходит при адсорбции на не растворимой в воде матрице или поверхности (Bennich et al., патент США 3720760), или путем ковалентного связывания (например, перекрестного связывания с глутаральдегидом) или путем инсолубилизации анти-CD79b антитела после образования комплекса между анти-CD79b антителом и CD79b, например, посредством иммунопреципитации.

Любой из вышеуказанных вариантов диагностики или детекции может быть осуществлен с использованием иммуноконъюгата согласно изобретению вместо анти-CD79b антитела или наряду с этим антителом.

В. Терапевтические методы

Антитело или иммуноконъюгат согласно изобретению могут быть использованы, например, в терапевтических методах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способам ингибирования роста или пролиферации клеток, либо *in vivo*, либо *in vitro*, где указанный способ включает обработку клеток анти-CD79b антителом или иммуноконъюгатом в условиях, способствующих связыванию иммуноконъюгата с CD79b. Термин «ингибирование роста или пролиферации» клеток означает снижение роста или пролиферации клеток по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%, и включает индуцирование гибели клеток. В некоторых вариантах изобретения указанной клеткой является опухолевая клетка. В некоторых вариантах изобретения указанной клеткой является В-клетка. В некоторых вариантах изобретения указанной клеткой является ксенотрансплантат, например, проиллюстрированный в описании настоящей заявки.

В одном из аспектов изобретения антитело или иммуноконъюгат согласно изобретению используют для лечения или предупреждения В-клеточно-пролиферативного расстройства. В некоторых вариантах изобретения указанное клеточно-пролиферативное расстройство ассоциируется с повышенным уровнем экспрессии и/или активности CD79b. Так, например, в некоторых вариантах изобретения В-клеточно-пролиферативное расстройство ассоциируется с повышенным уровнем экспрессии CD79b на поверхности В-клеток. В некоторых вариантах изобретения В-клеточно-пролиферативным расстройством является опухоль или рак. Примерами В-клеточно-пролиферативных расстройств, подвергаемых лечению антителами или иммуноконъюгатами согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная НХЛ, рецидивирующая агрессивная НХЛ, рецидивирующая бессимптомная НХЛ, не поддающаяся лечению НХЛ, не поддающаяся лечению бессимптомная НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома клеток коры головного мозга.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способам лечения В-клеточно-пролиферативного расстройства, включающим введение индивидууму эффективного количества анти-CD79b антитела или его иммуноконъюгата. В некоторых вариантах изобретения способ лечения В-клеточно-пролиферативного расстройства включает введение индивидууму эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего анти-CD79b антитело или анти-CD79b иммуноконъюгат, и необязательно по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, такое как средство, описанное ниже. В некоторых вариантах изобретения способ лечения В-клеточно-пролиферативного расстройства включает введение индивидууму

эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего (1) иммуноконъюгат, включающий анти-CD79b антитело и цитотоксическое средство, и необязательно (2) по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, такое как средство, описанное ниже.

5 В одном из аспектов изобретения, по меньшей мере некоторые антитела или иммуноконъюгаты согласно изобретению могут связываться с CD79b, происходящим от вида, не являющегося человеком. В соответствии с этим, антитела или иммуноконъюгаты согласно изобретению могут быть использованы для связывания с CD79b, например, в клеточной культуре, содержащей CD79b, в организме человека
10 или других млекопитающих (например, шимпанзе, павианов, игрунок, собакоподобных обезьян и макаков резусов, а также свиней или мышей), имеющих CD79b, с которым перекрестно реагирует антитело или иммуноконъюгат согласно изобретению. В одном из вариантов изобретения анти-CD79b антитело или иммуноконъюгат могут быть использованы для доставки CD79b в В-клетки путем контактирования антитела или
15 иммуноконъюгата с CD79b с образованием комплекса «антитело-антиген» или «иммуноконъюгат-антиген», и тем самым для обеспечения проникновения конъюгированного цитотоксина иммуноконъюгата вовнутрь клетки. В одном из вариантов изобретения указанным CD79b является человеческий CD79b.

В одном из вариантов изобретения анти-CD79b антитело или иммуноконъюгат могут
20 быть использованы в способе связывания CD79b у индивидуума, страдающего расстройством, ассоциированным с повышенным уровнем экспрессии и/или активности CD79b, где указанный способ включает введение индивидууму антитела или иммуноконъюгата в целях осуществления связывания CD79b у индивидуума. В одном из вариантов изобретения связанное антитело или связанный иммуноконъюгат
25 интернализуется в В-клетках, экспрессирующих CD79b. В одном из вариантов изобретения указанным CD79b является человеческий CD79b, а указанным индивидуумом является человек. Альтернативно индивидуумом может быть млекопитающее, экспрессирующее CD79b, с которым связывается анти-CD79b антитело. Кроме того, указанным индивидуумом может быть млекопитающее, которому вводят CD79b
30 (например, путем доставки CD79b или экспрессии трансгена, кодирующего CD79b).

Анти-CD79b антитело или иммуноконъюгат могут быть введены человеку в терапевтических целях. Кроме того, анти-CD79b антитело или иммуноконъюгат могут быть введены млекопитающему, не являющемуся человеком, у которого экспрессируется CD79b, с которым перекрестно связывается данное антитело (например, примату,
35 свинье, крысам или мышам), где указанное введение проводят в целях лечения данного животного или в целях использования этого животного в качестве модели человеческого заболевания. В последнем случае, такие животные-модели могут быть использованы для оценки терапевтической эффективности антител или иммуноконъюгатов (например, определения доз и времени проведения курса лечения).

40 При проведении терапии антитела или иммуноконъюгаты согласно изобретению могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими терапевтическими композициями. Так, например, антитела или иммуноконъюгаты согласно изобретению могут быть введены вместе с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством и/или адъювантом. В некоторых вариантах изобретения другим
45 терапевтическим средством являются цитотоксическое средство, химиотерапевтическое средство или рост-ингибирующее средство. В одном из таких вариантов химиотерапевтическим средством является средство или комбинация средств, таких как, например, цислофосфамид, гидроксид аунорубицин, адриамицин, доксорубицин,

винкристин (Oncovin™), преднизолон, CHOP, CVP или COP, или иммунотерапевтические средства, такие как анти-CD20 антитело (например, Rituxan®) или анти-VEGF антитело (например, Avastin®), где указанная комбинированная терапия может быть применена для лечения рака и/или В-клеточных расстройств, таких как В-клеточно-пролиферативные расстройства, включая лимфому, неходжкинскую лимфому (НХЛ), агрессивную НХЛ, рецидивирующую агрессивную НХЛ, рецидивирующую бессимптомную НХЛ, не поддающуюся лечению НХЛ, не поддающуюся лечению бессимптомную НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лейкоз, ретикулоэндотелиоз (РЭ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфому клеток коры головного мозга.

Такая вышеуказанная комбинированная терапия включает комбинированное введение (где два или более терапевтических средства включены в один и тот же препарат или в отдельные препараты) и раздельное введение, при котором введение антитела или иммуноконъюгата согласно изобретению может осуществляться до, во время и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Антитела или иммуноконъюгаты согласно изобретению могут быть также использованы в комбинации с лучевой терапией.

Антитело или иммуноконъюгат согласно изобретению (и любое дополнительное терапевтическое средство или адъювант) могут быть введены любыми подходящими способами, включая парентеральное введение, подкожное введение, внутрибрюшинное введение, внутрилегочное введение и интраназальное введение, и, если это необходимо для местного лечения, введение в пораженный участок. Парентеральными вливаниями являются внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитело или иммуноконъюгат могут быть введены путем периодического вливания, а в частности, со снижением доз антитела или иммуноконъюгата. Доза может быть введена любым подходящим способом, например, путем инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, отчасти, в зависимости от того, осуществляется ли такое введение сразу или в течение длительного периода времени.

Антитела или иммуноконъюгаты согласно изобретению приготавливают, разделяют на дозы и вводят в соответствии с хорошо известной медицинской практикой. Факторами, учитываемыми для приготовления таких композиций, являются конкретное расстройство, подвергаемое лечению, конкретное вскармливающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние конкретного пациента, этиологический фактор, вызывающий данное расстройство, участок, на который направлено данное средство, способ введения, схема введения и другие факторы, известные практическим врачам. Указанное антитело или иммуноконъюгат должны быть, но необязательно, приготовлены в виде композиции с одним или несколькими современными средствами, используемыми для предупреждения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антитела согласно изобретению, присутствующего в данной композиции, типа расстройства или способа его лечения и от других факторов, обсуждаемых выше. Указанные другие средства обычно вводятся в тех же самых дозах и теми же способами, которые обычно использовались ранее, либо эти дозы составляют примерно 1-99% от используемых ранее доз, либо такие средства могут быть введены в любой дозе и любым способом, которые могут быть, при необходимости, определены эмпирически или клиническим методом.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая доза антитела или

иммуноконъюгата согласно изобретению (при их использовании отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтические средства) зависит от типа заболевания, подвергнутого лечению, типа антитела или иммуноконъюгата, тяжести и курса лечения заболевания, независимо от того вводят ли указанное антитело или иммуноконъюгат в профилактических или терапевтических целях, от проводимого ранее лечения, от истории болезни пациента и его восприимчивости к данному антителу или иммуноконъюгату, и от назначения лечащего врача. Такое антитело или иммуноконъюгат могут быть введены пациенту один раз или несколько раз во время проведения курса лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания начальная, предварительно установленная доза антитела или иммуноконъюгата, вводимого пациенту, составляет примерно 1-100 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг/дозу), независимо от того, осуществляют ли одноразовое или многократное введение или непрерывную инфузию данного антитела. Одна типичная суточная доза может составлять примерно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. Для повторного введения в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение может проводиться до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое подавление симптомов заболевания. Одна репрезентативная доза указанного антитела или иммуноконъюгата может составлять примерно от 0,05 мг/кг до 10 мг/кг. Таким образом, пациенту могут быть введены одна или несколько доз, составляющих примерно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг антитела или иммуноконъюгата (или любые их комбинации). Такие дозы могут быть введены периодически, например, через каждую неделю или через каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал примерно от 2 до 20 или например, примерно 6 доз антитела или иммуноконъюгата). Вначале может быть введена более высокая нагрузочная доза, а затем могут быть введены одна или несколько более низких доз. Репрезентативная схема введения доз включает введение первоначальной нагрузочной дозы, составляющей примерно 4 мг/кг, а затем еженедельное введение поддерживающей дозы примерно 2 мг/кг антитела. Однако могут быть применены и другие схемы введения доз. Мониторинг эффекта такой терапии может быть легко проведен с применением стандартных методов и анализов.

С. Анализы на активность

Анти-CD79b антитела и иммуноконъюгаты согласно изобретению могут быть охарактеризованы на их физическую/химическую и/или биологическую активность с применением различных анализов, известных специалистам.

1. Анализы на активность

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к анализам для идентификации анти-CD79b антител или их иммуноконъюгатов, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, способность ингибировать рост или пролиферацию клеток (например, активность, направленную на «уничтожение клеток») или способность индуцировать гибель клеток, включая запрограммированную клеточную гибель (апоптоз). Настоящее изобретение также относится к антителам или иммуноконъюгатам, обладающим такой биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах изобретения анти-CD79b антитело или его иммуноконъюгат тестируют на способность ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vitro*. Анализы на ингибирование роста или пролиферации клеток хорошо известны специалистам. Некоторые анализы на пролиферацию клеток, называемые здесь анализами на «уничтожение клеток», позволяют определять жизнеспособность клеток. Одним из

таких анализов является люминесцентный анализ на жизнеспособность клеток CellTiter-GloTM, который является коммерчески доступным и был разработан фирмой Promega (Madison, WI). Такой анализ позволяет определять число жизнеспособных клеток в культуре, исходя из количественной оценки присутствия АТФ, которое является показателем наличия метаболически активных клеток. См. Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, патент США № 6602677. Анализ может быть проведен в 96- или 384-луночном формате, что делает возможным проведение автоматизированного высокоэффективного скрининга (HTS). См. Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404.

Процедура анализа включает добавление одного реагента (реагента CellTiter-Glo[®]) непосредственно в культивируемые клетки. Это приводит к лизису клеток и к продуцированию люминесцентного сигнала, вырабатываемого посредством люциферазной реакции. Люминесцентный сигнал пропорционален количеству присутствующего АТФ, которое прямо пропорционально числу жизнеспособных клеток, присутствующих в культуре. Данные могут быть зарегистрированы на люминометре или на визуализирующем устройстве, снабженном камерой с зарядовой связью. Люминесцентный сигнал, полученный на выходе такого устройства, выражали в относительных световых единицах (RLU).

Другой анализ на пролиферацию клеток представляет собой анализ «МТТ», а именно колориметрический анализ, в котором измеряют уровень окисления бромиды 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия до формаза под действием митохондриальной редуктазы. Подобно анализу CellTiter-GloTM, этот анализ позволяет определять число метаболически активных клеток, присутствующих в клеточной культуре. См., например, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, и Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

В одном из аспектов изобретения анти-CD79b антитело тестируют на способность индуцировать гибель клеток *in vitro*. Анализы на индуцирование гибели клеток хорошо известны специалистам. В некоторых вариантах изобретения такие анализы позволяют определять, например, потерю целостности мембраны, на что указывает поглощение йодида пропидия (PI), трипанового синего (см. Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11), или 7AAD. В репрезентативном анализе с поглощением PI клетки культивируют в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM):среде Хэмса F-12 (50:50), в которую были добавлены 10% термоинактивированная FBS (Hyclone) и 2 mM L-глутамин. Таким образом, данный анализ осуществляют в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток. Клетки высевают в 100×20-мм чашки при плотности 3×10^6 клеток на чашку и оставляют на ночь для адгезии. Затем среду удаляют и заменяют только свежей средой или средой, содержащей различные концентрации антитела или иммуноконъюгата. Затем клетки инкубируют в течение 3 дней. После обработки монослои промывают PBS и отделяют путем трипсинизации. После этого клетки центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 минут при 4°C, затем осадок

ресуспендируют в 3 мл холодного Ca^{2+} -связывающего буфера (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) и разделяют на аликвоты в пробирках (35 мм, 12×75) с плотно закрывающейся крышкой (1 мл на пробирку, 3 пробирки на каждую группу обработки) для удаления скоплений клеток. Затем в пробирки добавляют PI (10 мкг/мл). Образцы анализируют на проточном цитометре FACSCAN[®] и с использованием компьютерной программы FACSCONVERT[®] CellQuest (Becton Dickinson). Таким образом могут быть идентифицированы антитела или иммуноконъюгаты, которые индуцируют

статистически значимые уровни гибели клеток, как было определено по поглощению PI.

В одном из аспектов изобретения анти-CD79b антитело или иммуноконъюгат тестируют на способность индуцировать апоптоз (запрограммированную клеточную гибель) *in vitro*. Репрезентативным анализом на антитела или иммуноконъюгаты, индуцирующие апоптоз, является анализ на связывание с аннексином. В репрезентативном анализе на связывание с аннексином клетки культивируют и высевают в чашки, как описано в предыдущем абзаце. Среду удаляют и заменяют только свежей средой или средой, содержащей 0,001-10 мкг/мл антитела или иммуноконъюгата. После инкубирования в течение трех дней монослои промывают PBS и отделяют путем трипсинизации. После этого клетки центрифугируют, ресуспендируют в Ca^{2+} -связывающем буфере и разделяют на аликвоты в пробирках, как описано в предыдущем абзаце. В пробирки добавляют меченый аннексин (например, аннексин V-ФИТЦ) (1 мкг/мл). Образцы анализируют на проточном цитометре FACSCAN™ и с помощью компьютерной программы FACSCONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Таким образом идентифицируют антитела или иммуноконъюгаты, индуцирующие статистически значимые уровни связывания с аннексином по сравнению с контролем. Другим репрезентативным анализом на антитела или иммуноконъюгаты, которые индуцируют апоптоз, является колориметрический ELISA-анализ с использованием ДНК гистона, который позволяет детектировать межнуклеосомную деградацию геномной ДНК. Такой анализ может быть осуществлен с использованием, например, ELISA-набора для детекции гибели клеток (Roche, Palo Alto, CA).

Клетками, используемыми в любом из вышеупомянутых анализов *in vitro*, являются клетки или клеточные линии, которые обычно экспрессируют CD79b или которые были сконструированы так, чтобы они экспрессировали CD79b. Такими клетками являются опухолевые клетки, экспрессирующие CD79b по сравнению с нормальными клетками, происходящими от той же самой ткани. Такими клетками также являются клеточные линии (включая опухолевые клеточные линии), которые экспрессируют CD79b, и клеточные линии, которые обычно не экспрессируют CD79b, но были трансфицированы нуклеиновой кислотой, кодирующей CD79b.

В одном из аспектов изобретения анти-CD79b антитело или его иммуноконъюгат тестируют на способность ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vivo*. В некоторых вариантах изобретения анти-CD79b антитело или его иммуноконъюгат тестируют на способность ингибировать рост опухоли *in vivo*. Для такого тестирования могут быть использованы системы модели *in vivo*. В репрезентативной системе ксенотрансплантата человеческие опухолевые клетки вводят животному с ослабленным иммунитетом, не являющемуся человеком, например, мышам SCID. Этому животному вводят антитело или иммуноконъюгат согласно изобретению. Затем оценивают способность антитела или иммуноконъюгата ингибировать или снижать рост опухоли. В некоторых вариантах вышеуказанной системы ксенотрансплантата, человеческими опухолевыми клетками являются опухолевые клетки, происходящие от человека. Такими клетками, подходящими для получения модели ксенотрансплантата, являются клетки человеческого лейкоза и клеточные линии человеческой лимфомы, которыми являются, но не ограничиваются ими, клетки VJAB-luc (например, EBV-негативные клеточные линии лимфомы Беркитта, трансфицированные люциферазным репортерным геном), клетки Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), клетки SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495), клетки DoHH2 (см. Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991), и Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8:1385-1391 (1994)), клетки Granta-519 (см.

Jadayel, D.M. et al, Leukemia 11(1):64-72 (1997)). В некоторых вариантах изобретения человеческие опухолевые клетки вводят животному с ослабленным иммунитетом, не являющемуся человеком, путем подкожной инъекции или трансплантации в подходящий участок, например, в жировое тело молочной железы.

2. Анализы на связывание и другие анализы

В одном из аспектов изобретения анти-CD79b антитело тестируют на антигенсвязывающую активность. Так, например, в некоторых вариантах изобретения анти-CD79b антитело тестируют на способность связываться с CD79b, экспрессируемым на поверхности клеток. Такое тестирование может быть проведено с помощью FACS-анализа.

В одном из аспектов изобретения для идентификации моноклонального антитела, которое конкурирует с мышинным антителом MA79b, с гуманизированным антителом MA79b.v17 и/или с гуманизированным антителом MA79b.v28 и/или с гуманизированным антителом MA79b.v32 за связывание с CD79b, могут быть проведены анализы на конкурентное связывание. В некоторых вариантах изобретения такое конкурирующее антитело связывается с тем же самым эпитопом (например, с линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается мышинное антитело MA79b, гуманизированное антитело MA79b.v17 и/или гуманизированное антитело MA79b.v18 и/или гуманизированное антитело MA79b.v28 и/или гуманизированное антитело MA79b.v32. Репрезентативными анализами на конкурентное связывание являются, но не ограничиваются ими, рутинные анализы, такие как анализы, описанные в публикации Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Подробное описание репрезентативных методов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, можно найти в публикации Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если каждое из них блокирует связывание другого на 50% или более.

В репрезентативном анализе на конкурентное связывание иммобилизованный CD79b инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с CD79b (например, мышинное антитело MA79b, гуманизированное антитело MA79b.v17 и/или гуманизированное антитело MA79b.v18 и/или гуманизированное антитело MA79b.v28 и/или гуманизированное антитело MA79b.v32) и второе немеченое антитело, которое тестируют на его способность конкурировать с первым антителом за связывание с CD79b. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный CD79b инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубирования в условиях, благоприятствующих связыванию первого антитела с CD79b, избыток несвязанного антитела удаляют, и определяют количество метки, ассоциированной с иммобилизованным CD79b. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным CD79b в тестируемом образце значительно ниже количества метки в контрольном образце, то это означает, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с CD79b. В некоторых вариантах изобретения иммобилизованный CD79b присутствует на поверхности клеток или в мембранном препарате, полученном из клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD79b.

В одном из аспектов изобретения очищенные анти-CD79b антитела могут быть дополнительно охарактеризованы путем проведения серии анализов, включая, но не ограничиваясь ими, N-концевое секвенирование, аминокислотный анализ, эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ),

проводимую в неденатурирующих условиях, масс-спектрометрию, ионообменную хроматографию и гидролиз папаином.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к модифицированному антителу, которое обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желаемым кандидатом на применение во многих целях, а именно в том случае, когда важным фактором является время полужизни антитела *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) либо являются необязательными, либо нежелательными. В некоторых вариантах изобретения определяют активность Fc антитела для гарантии того, что будут сохраняться лишь желаемые свойства. Для подтверждения снижения/истощения CDC- и/или ADCC-активности могут быть проведены анализы на цитотоксичность *in vitro* и/или *in vivo*. Так, например, для гарантии того, что данное антитело не будет связываться с Fc γ R (а следовательно, вероятно, не будет обладать ADCC-активностью), но будет сохранять способность связываться с FcRn, могут быть проведены анализы на связывание с Fc-рецептором (FcR). Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках систематизирована в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Пример *in vitro* анализа для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы описан в патентах США №№ 5500362 или 5821337. Подходящими эффекторными клетками для проведения таких анализов являются моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно ADCC-активность представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в модели животного, такой как модель, описанная в публикации Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Для подтверждения того, что данное антитело неспособно связываться с C1q, а поэтому оно не обладает CDC-активностью, могут быть также проведены анализы на связывание с C1q. Для анализа активации комплемента может быть проведен CDC-анализ, например, анализ, описанный в публикации Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Оценка связывания с FcRn, а также клиренса/времени полужизни *in vivo* может быть также осуществлена методами, известными специалистам.

Нижеследующие примеры приводятся лишь в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничение объема изобретения.

Все патенты и публикации, цитируемые в описании настоящей заявки, полностью вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

35 Примеры

Коммерчески доступные реагенты, указанные в примерах, были использованы в соответствии с инструкциями производителей, если это не оговорено особо. Антителами, используемыми в примерах, являются коммерчески доступные антитела, и такими антителами являются, но не ограничиваются ими, анти-CD79b антитело (антитело, закупленное фирмой Biomed (Foster City, CA) или BD Bioscience (San Diego, CA) или Ancell (Bayport, MN)), анти-CD79b антитело (выделенное из гибридом, депонированных в ATCC как HB11413 20 июля 1993 г.), и химерные анти-CD79b антитела (содержащие переменные домены антител, продуцируемых из гибридом, депонированных в ATCC как HB11413 20 июля 1993 г.). Источником получения этих клеток, идентифицированных в нижеследующих примерах и во всем описании изобретения под регистрационными номерами ATCC, является Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA.

Пример 1: Получение гуманизированного анти-CD79b антитела

Номера остатков даны по Кэбату (Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological*

interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). В описании изобретения используются однобуквенные обозначения аминокислот. Вырожденность ДНК представлена кодом IUB (N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/C/T, K=G/T, M=A/C, R=A/G, S=G/C, W= A/T, Y=C/T).

5 А. Гибридное гуманизированное анти-CD79b антитело

Были получены различные гуманизированные анти-CD79b антитела. Последовательности доменов VL и VH мышинового антитела MA79b (MA79b) (Roswell Park Cancer Institute; Okazaki et al., Blood, 81:84-94 (1993)) выравнивали с последовательностями доменов человеческой консенсусной VL каппа I (huKI) и
 10 человеческой консенсусной VH подгруппы III (huIII). Для получения HVR-гибрида использовали акцепторную каркасную область VH, которая отличалась от домена человеческой консенсусной VH подгруппы III в 3 положениях: R71A, N73T и L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). Гипервариабельные области мышинового MA79b (MA79b) присоединяли к каркасной области акцепторной человеческой
 15 консенсусной последовательности и получали прямой HVR-гибрид MA79b (называемый здесь “гибридом MA79b” или “MA79b-гибридом” или «MA79b-связанным «гуманизированным антителом» или «huMA79b-гибридом»). В домене VL нижеследующие области присоединяли к человеческой консенсусной акцепторной последовательности в положениях 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) (фигуры 7A-B). В
 20 домене VH присоединяли области в положениях 26-35 (H1), 49-65 (H2) и 93-102 (H3) (фигуры 8A-B). В публикации MacCallum et al. (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)) проанализированы кристаллические структуры комплекса «антиген-антитело», и было обнаружено, что положения 49, 93 и 94 тяжелой цепи являются частью контактной области, и, в случае гуманизированных антител, они входят в определение
 25 HVR-H2 и HVR-H3.

Вариант, полученный путем прямого присоединения (huMA79b-гибрид), был продуцирован методом мутагенеза Kunkel как Fab, представленный на фаге, и как IgG, с использованием отдельного олигонуклеотида для каждой гипервариабельной области. Соответствующие клоны оценивали путем секвенирования ДНК.

30 В. Варианты гибридов гуманизированного анти-CD79b антитела

Варианты гибридов анти-CD79b антитела, которые включают разнообразие мутантов в гипервариабельных областях MA79b-связанного «гуманизированного» антитела, получали с использованием фаговых библиотек. Варианты гибридов анти-CD79b антител
 35 включают мутации в одном положении в HVR (фигура 9) или мутации во многих положениях в HVR (фигура 10).

С. Отбор фага

Для отбора фага внеклеточный домен CD79b (huCD79b_{ecd}) (2 мкг/мл) иммобилизовали в PBS на микротитрационных планшетах MaxiSorp (Nunc) в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали в течение 1 часа с использованием казеинового блокатора
 40 (Pierce). Фаг собирали из супернатанта культуры и суспендировали в PBS, содержащем 0,5% BSA и 0,05% Твина 20 (PBSBT). После добавления фаговой библиотеки и отбора фага в течение 2 часов, лунки микротитрационного планшета интенсивно промывали PBS, содержащим 0,05% Твина 20 (PBST) для удаления несвязанного фага, а связанный фаг элюировали путем инкубирования лунок со 100 мМ HCl в течение 30 минут.
 45 Жесткость отбора может быть повышена в процессе проведения последовательных раундов отбора путем увеличения числа промывок PBST или путем инкубирования с растворимым huCD79b_{ecd} для увеличения периода времени до элюирования.

Элюированный фаг нейтрализовали 1 М трисом, pH 8, и амплифицировали с

использованием клеток XL1-Blue и фага-помощника M13/KO7, а затем культивировали в течение ночи при 37°C в 2YT, 50 мкг/мл карбенациллина. Титры фага, элюированного с мишень-содержащей лунки, сравнивали с титрами фага, выделенного из лунки, не содержащей мишени, для оценки уровня обогащения.

5 D. Получение Fab и получение IgG

В целях экспрессии белка Fab для измерения аффинности, между тяжелой цепью и g3 в векторе фагового представления встраивали стоп-кодон. Клоны переносили в клетки E. coli 34B8 и культивировали в полной среде C.R.A.P. при 30°C (Presta et al. Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Клетки собирали путем центрифугирования, суспендировали в PBS, 100 мкМ PMSF, 100 мкМ бензамидина, 2,4 мМ EDTA, и разрушали в открытом виде с использованием микрофлюидизатора. Fab очищали с помощью аффинной хроматографии на G-белке.

Для проведения скрининга варианты IgG сначала продуцировали в клетках 293. Векторы, кодирующие VL и VH (25 мкг), переносили в клетки 293 с использованием системы FuGene. 500 мкл FuGene смешивали с 4,5 мл среды DMEM, не содержащей FBS, и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. К этой смеси добавляли каждую цепь (25 мкг) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут, а затем переносили в колбу для трансфекции в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. На следующий день среду, содержащую смесь для трансфекции, удаляли и заменяли 23 мл среды PS04, содержащей 0,1 мл/л микроэлементов (A0934) и 10 мг/л инсулина (A0940). Клетки инкубировали еще 5 дней, а затем среду собирали при 1000 об./мин в течение 5 минут и подвергали стерильной фильтрации через 0,22-мкм фильтр, связывающийся с белком, присутствующим в небольшом количестве. После добавления 2,5 мл 0,1% PMSF для каждой 125 мл среды, образцы можно хранить при 4°C.

25 E. Определение аффинности (анализ Biacore)

Для определения аффинности MA79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела, внеклеточный домен человеческого CD79b (huCD79b_{ecd}) экспрессировали в клетках CHO отдельно или в виде Fc-гибрида (huCD79b_{ecd}-Fc) и очищали стандартными методами. Кроме того, пептид из 16 аминокислот (ARSEDRYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 16), содержащий эпитоп для MA79b, синтезировали стандартными методами.

Характеризация эпитопа для антитела MA79b (обозначенного на фигуре 19 как «тестируемый пептид») описана в заявке на патент США № 11/462336, поданной 3 августа 2006 г. Эпитоп для MA79b был локализован во внеклеточной пептидной области, расположенной на значительном расстоянии от трансмембранного домена, и присутствовал в полноразмерной и в усеченной формах человеческого CD79b (см. публикацию Cragg, Blood, 100(9):3068-76 (2002)), относящуюся к нормальным и злокачественным B-клеткам (Hashimoto, S. et al., Mol. Immunol., 32(9):651-9 (1995); Alfarano et al., Blood, 93(7):2327-35 (1999)). Усеченная форма CD79b не содержала полноразмерного внеклеточного Ig-подобного домена (внеклеточный Ig-подобный домен, который не присутствует в сплайсированной усеченной форме CD79b, представлен в рамке на фигуре 19).

Уровень связывания Fab- и IgG-вариантов MA79b, MA79b-связанного «гуманизированного» антитела или MA79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела с иммобилизованным huCD79b_{ecd} или huCD79b-Fc или с пептидом из 16 аминокислот, содержащим эпитоп для MA79b, измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса. Измерение аффинности осуществляли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcoreTM-2000. Антиген, huCD79b_{ecd} или

huCD79b-Fc иммобилизовали (приблизительно 50-200 ЕО) в 10 мМ ацетата натрия, pH 4,8, на сенсорном чипе CM5. Величины аффинности зависят от количества иммобилизованного huCD79b_{ecd}, что в значительной степени обусловлено эффектом

5 различия дней, нормализовали по МА79b, который был одновременно использован в качестве стандарта. В тех экспериментах, в которых оценивали уровень связывания с пептидом из 16 аминокислот, содержащим эпитоп для МА79b (ARSEDYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 16), биотинилированный пептид иммобилизовали (приблизительно 20 ЕО) на сенсорном чипе, покрытом стрептавидином. Очищенный МА79b-присоединенный

10 вариант «гуманизированного» антитела (в виде Fab или IgG) (2-кратное серийное разведение 0,5-1000 нМ в PBST) впрыскивали при скорости потока 30 мкл/мин. Каждый образец анализировали по 4-минутной ассоциации и 10-минутной диссоциации. После каждого впрыска чип регенерировали с использованием 10 мМ глицина, pH 1,7.

Величину отклика реакции связывания корректировали путем вычитания величины, полученной для контрольной проточной кюветы, из величины, полученной для проточной кюветы, содержащей МА79b-присоединенный вариант «гуманизированного» антитела (в виде Fab или IgG). Для кинетического анализа использовали лангмюровскую модель 1:1 построения кривой по данным k_{on} и k_{off} .

20 F. Анализ на связывание (FACS-анализ)

Для дополнительного определения уровня связывания Fab-фрагмента МА79b-связанного «гуманизированного» антитела или его вариантов проводили оценку связывания вариантов Fab и/или IgG с клетками DoHH-2 с помощью FACS-анализа. Кроме того, с помощью FACS-анализа проводили оценку уровня связывания МА79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела с клетками ВJAB, содержащими

25 люциферазу.

Для проведения FACS-анализа Fab-вариантов МА79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела (МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (варианта IgG, используемого в качестве контроля)), клетки DoHH-2 (1×10^6 в объеме

30 100 мкл) сначала инкубировали в присутствии или при отсутствии 1 мкг исходного мышинового моноклонального анти-CD79b антитела (МА79b) в течение 30 минут, а затем добавляли 1 мкг отдельного варианта Fab (или контрольного антитела). В качестве «второго» детектирующего антитела использовали ФЭ-конъюгированное мышинное антитело против человеческой легкой цепи Ig каппа (клон G20-193, BD Biosciences, San

35 Diego, CA), поскольку все варианты Fab несут легкую цепь каппа, а клетки DoHH-2 не экспрессируют на своей поверхности легкую цепь каппа.

Для дополнительного FACS-анализа вариантов IgG МА79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела (варианта IgG chMA79b, используемого в качестве контроля), 1,0 мкг, 0,1 мкг или 0,01 мкг антитела титровали на миллион клеток ВJAB, содержащих люциферазу. В качестве «второго» детектирующего антитела использовали

40 ФЭ-конъюгированное мышинное антитело против человеческого Ig.

G. Определение аффинности (анализ Скэтчарда)

Для дополнительного определения уровня связывания вариантов IgG, имеющих модификации в HVR-L2 и HVR-H3 (huMA79b L2/H3), анализировали связывание йодированных вариантов IgG с клетками ВJAB, экспрессирующими человеческий CD79b

45 и CD79b собакоподобных обезьян, а затем проводили анализ Скэтчарда.

Для проведения анализа Скэтчарда 0,5 нМ I^{125} -меченого МА79b или huMA79b L2/H3 подвергали конкурентному связыванию с немеченым МА79b или huMA79b L2/H3,

соответственно, в концентрации в пределах от 50 до 0,02 нМ (12-стадийное серийное разведение 1:2) в присутствии трансфицированной клеточной линии BJAB, стабильно экспрессирующей CD79b собакоподобных обезьян и эндогенный человеческий CD79b. После 4-часового инкубирования при 4°C клетки промывали, и клеточный осадок считывали на гамма-счетчике (на автоматическом гамма-счетчике 1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Все вычисления проводили с тремя повторностями, и подсчет осуществляли в течение 10 минут. Для вычисления Kd использовали среднее число импульсов в минуту (CPM), и такое вычисление осуществляли с помощью компьютерной программы New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA).

Результаты и обсуждение

А. Результаты продуцирования гуманизированного анти-CD79b антитела

Человеческая акцепторная каркасная область, используемая для получения гуманизированного анти-CD79b антитела, содержит домен VL консенсусной человеческой последовательности каппа I и вариант домена VH человеческой консенсусной последовательности подгруппы III. Вариант домена VH имеет 3 замены в человеческой консенсусной последовательности в положениях R71A, N73T и L78A. Последовательности доменов VL и VH MA79b выравнивали с человеческими последовательностями каппа I и подгруппы III, где каждую HVR идентифицировали, а затем присоединяли к человеческой акцепторной каркасной области с получением HVR-гибрида, который может быть представлен на фаге как Fab (фигуры 7 и 8).

Фаг представляет MA79b-гибрид в виде Fab, связанного с иммобилизованным huCD79b_{ecd} (данные не приводятся). Однако, если последовательность huMA79b-гибрида экспрессировалась как IgG, то FACS-анализ на аффинность его связывания с huCD79b_{ecd} указывал на то, что аффинность связывания снижалась в более чем 100 раз (данные не приводятся), а анализ Biacore указывал на более чем 50-кратное снижение (фигура 11).

1. Репарация CDR

MA79b-связанные варианты «гуманизированного» антитела, которые обладали способностью связываться с иммобилизованным huCD79b_{ecd}, идентифицировали с использованием нижеследующих замен в последовательностях.

Изменения в HVR в VL имелись лишь в библиотеках, содержащих замены в одном положении, и такие изменения приводятся на фигуре 9 (для мутации L1: Q27K (SEQ ID NO: 17; мутации SPL-2), (для мутации L2: L54R (SEQ ID NO: 18), E55K (SEQ ID NO: 19)), и (для мутации L3: E93S (SEQ ID NO: 20; мутация SPL-5), E93K (SEQ ID NO: 21)).

Изменения в HVR в L2, L3, H1 и H3 в HVR имелись лишь в библиотеках, содержащих замены в нескольких положениях, и такие изменения приводятся на фигуре 10 (для мутации L2: S52R, N53K, E55G и S56R (SEQ ID NO: 22; мутация L2-2); N53R (SEQ ID NO: 23); S52R, N53K, E55G и S56N (SEQ ID NO: 24); S52R, N53K, E55K и S56R (SEQ ID NO: 25); S52R, N53Y, E55K и S56R (SEQ ID NO: 26; мутация L2-29); S52R, N53K и E55K (SEQ ID NO: 27); S52R, N53K и E55A (SEQ ID NO: 28); S52G, N53I, E55A и S56R (SEQ ID NO: 29); S52R, N53K, E55R (SEQ ID NO: 30); S52R, N53K и E55G (SEQ ID NO: 31; мутация L2-38); S52R, N53H, E55K и S56R (SEQ ID NO: 32); A51S, S52R, N53Y, E55S и S56R (SEQ ID NO: 33); A51G, N53K, E55L и S56R (SEQ ID NO: 34); L54R и E55K (SEQ ID NO: 35); N53K и E55G (SEQ ID NO: 36); S52R, N53Y, E55R и S56R (SEQ ID NO: 37); S52R, N53R, E55R и S56T (SEQ ID NO: 38); S52R, N53R, E55G и S56R (SEQ ID NO: 39); S52R, N53Q, L54R, E55K и S56R (SEQ ID NO: 40); S52R, N53K, E55L и S56R (SEQ ID NO: 41); S52R, N53K, E55K и S56N (SEQ ID NO: 42); S52R, N53K, E55G и S56T (SEQ ID NO: 43); S52R, N53K,

E55G и S56G (SEQ ID NO: 44); и S52R, N53K, E55A и S56R (SEQ ID NO: 45)), (для мутации L3: E93A (SEQ ID NO: 46); E93Q (SEQ ID NO: 47); отсутствие мутации (SEQ ID NO: 48); E93D (SEQ ID NO: 49); E93L (SEQ ID NO: 50); Q89N, Q90N, E93G и T97N (SEQ ID NO: 51); Q90P, S91D, D94A и L96R (SEQ ID NO: 52); Q89D, S91R и E93A (SEQ ID NO: 53)),
 5 (для мутации H1: T28P, S30T, S31R и E35S (SEQ ID NO: 54); T28P, S30R и E35Q (SEQ ID NO: 55); T28P, S30T и E35N (SEQ ID NO: 56); T28P, S30T, S31R и E36N (SEQ ID NO: 57; мутация H1-6)); S30N, S31R и E35N (SEQ ID NO: 58); T28S и S30K (SEQ ID NO: 59); G26P, T28S, F29L, S30C, S31T, W33F и E35D (SEQ ID NO: 60); T28Y и S30T (SEQ ID NO: 61); T28P, S30G, S31R, I34V и E35N (SEQ ID NO: 62); S30K и S31K (SEQ ID NO: 63); T28P,
 10 S30T и E35Q (SEQ ID NO: 64); T28P, S30R и S31R (SEQ ID NO: 65); T28P, F29V, S30G, S31R и E35S (SEQ ID NO: 66); T28P, S30N, S31R и E35N (SEQ ID NO: 67; мутация H1-1); T28G, S30T и E35S (SEQ ID NO: 68); S30T, I34L и E35S (SEQ ID NO: 69); S30T (SEQ ID NO: 70); S31G и E35N (SEQ ID NO: 71); S30R, S31R и E35N (SEQ ID NO: 72); T28S, S30R и E35N (SEQ ID NO: 73); T28S, S30R, S31R и E35N (SEQ ID NO: 74); T28S, S30R и S31R
 15 (SEQ ID NO: 75); T28S, S30P, I34L и E35Q (SEQ ID NO: 76); T28P, S30T и S31R (SEQ ID NO: 77); T28P и S31G (SEQ ID NO: 78); T28P, S30R и E35S (SEQ ID NO: 79); T28P, S30R и E35N (SEQ ID NO: 80); T28P, S30R и S31G (SEQ ID NO: 81); T28P, S30N и S31R (SEQ ID NO: 82); T28P, S30N, S31G и E35N (SEQ ID NO: 83); T28N, F29V, I34L и E35S (SEQ ID NO: 84); Y27F, T28P, S30T и E35S (SEQ ID NO: 85); и Y27F, T28P, S30N, S31R и E35N (SEQ ID
 20 NO: 86)) и (для мутации H3: V98I и F100L (SEQ ID NO: 87; мутация H3-12); мутация отсутствует (SEQ ID NO: 88); Y99K и F100L (SEQ ID NO: 89); F100L (SEQ ID NO: 90); V98I (SEQ ID NO: 91); V98F, Y99C и F100L (SEQ ID NO: 92); F100L (SEQ ID NO: 93); V98I, Y99R и F100L (SEQ ID NO: 94; мутация H3-10); V98I, Y99K и F100L (SEQ ID NO: 95); V98I и Y99R (SEQ ID NO: 96); V98I (SEQ ID NO: 97); D101S (SEQ ID NO: 98); Y99V и
 25 F100L (SEQ ID NO: 99); Y99R и F100L (SEQ ID NO: 100); Y99R (SEQ ID NO: 101); Y99F и F100L (SEQ ID NO: 102); V98I и F100L (SEQ ID NO: 103); V98I (SEQ ID NO: 104); V96R, Y99C и F100L (SEQ ID NO: 105); и V96I (SEQ ID NO: 106)).

Отбор клонов проводили в другом формате в виде Fab для FACS-анализа и в виде IgG для последующего анализа Biacore и Скэтчарда.

30 а. Определение аффинности (анализ Biacore)

Как показано на фигуре 11, где проиллюстрирован анализ Biacore, такой метод CDR-репарации позволяет идентифицировать множество изменений в отдельной последовательности, которые повышают аффинность MA79b-связанного «гуманизированного» антитела. Анализ, проводимый с помощью поверхностного
 35 плазмонного резонанса, показал, что хотя ни один из протестированных вариантов с одной HVR-заменой не обладал аффинностью, аналогичной аффинности MA79b, однако, комбинация замен, идентифицированных в HVR-L2 и HVR-H3 (MA79b-связанный вариант «гуманизированного» антитела L2/H3; также обозначаемый здесь huMA79b L2/H3), приводила к образованию варианта (фигура 11), обладающего аффинностью,
 40 аналогичной аффинности антитела MA79b при его связывании с иммобилизованным huCD79b_{ecd} или huCD79b_{ecd}-Fc или пептидом из 16 аминокислот, содержащим эпитоп для MA79b, как было определено в анализе Biacore.

Анализ на связывание мономера (Fab) и димера (IgG) MA79b с антигеном (huCD79b_{ecd}-Fc) (фигура 11, ряд 1, ср. столбцы для Fab и IgG) дал основание
 45 предположить, что компонент, обладающий в 100 раз большей авидностью и присутствующий в MA79b, может отсутствовать в вариантах с улучшенной аффинностью. В частности, в MA79b-связанном варианте «гуманизированного» антитела L2-2 (также обозначаемого здесь huMA79b L2-2), который обнаруживает 5-кратное

повышение уровня мономерного связывания по сравнению с МА79b (фигура 11, ряды 1 и 3, ср. столбцы для Fab), после изменения формата huMA79b L2-2 как IgG (фигура 11, ряд 4, ср. столбцы для Fab с IgG) какого-либо кажущегося повышения аффинности не наблюдалось. Кроме того, исходное HVR-связанное «гуманизированное» антитело МА79b (huMA79b-гибрид) продемонстрировало потерю связывания такого компонента с авидностью (фигура 11, ряд 2, ср. столбцы для Fab с IgG). Способность повышения уровня связывания посредством авидности может оказаться желательной при связывании с антигенами клеточной поверхности.

b. Определение аффинности (анализ Скэтчарда)

Как было определено в анализе Скэтчарда, такой метод CDR-репарации позволяет идентифицировать множество замен в отдельной последовательности, которые повышают аффинность МА79b-связанного «гуманизированного» антитела. В частности, анализы на клеточное связывание показали, что аффинность связывания МА79b и МА79b-связанного варианта «гуманизированного» антитела L2/H3 (huMA79b L2/H3) (полученного в другом формате, таком как IgG) с клетками BJAB, стабильно экспрессирующими CD79b собакоподобных обезьян и эндогенный человеческий CD79b, имела величины K_d 0,63 нМ (МА79b; $K_d=0,63\pm0,14$ нМ) и 0,52 нМ (huMA79b L2/H3; $K_d=0,52\pm0,1$ нМ), соответственно (данные не приводятся), как было определено в анализе Скэтчарда.

c. Определение уровня связывания (FACS-анализ)

Как было оценено с помощью FACS-анализа, такой метод CDR-репарации позволяет идентифицировать множество замен в отдельной последовательности, приводящих к повышению уровня связывания МА79b-связанного «гуманизированного» антитела (huMA79b-гибрида) с клетками DoHH-2 (данные не приводятся). В частности, FACS-анализ Fab-вариантов (мутации L2-2, H3-10 и H1-1), выделенных из библиотек SP и 6 библиотек SR, в клетках DoHH-2, указывал на связывание Fab-вариантов и huMA79b-гибрида (представленного в новом формате, таком как IgG) с клетками DoHH-2 (данные не приводятся). Кроме того, FACS-анализ Fab-вариантов показал, что связывание Fab-вариантов с клетками DoHH-2 блокируется в результате предварительного инкубирования с мышинным анти-CD79b моноклональным антителом (МА79b) (данные не приводятся).

2. Репарация каркасной области

Модификации последовательности HVR, введенные в HVR-L2 huMA79b L2/H3-вариант, радикально отличались от модификаций, наблюдаемых в любой человеческой зародышевой линии. Было обнаружено, что вариант huMA79b L2/H3, при его конъюгировании с DM1, эффективно ингибирует рост опухоли у мышей с моделью ксенотрансплантата *in vivo* (таблица 9). Поскольку анализ на мономерное связывание (Fab) и димерное связывание (IgG) huMA79b L2/H3-варианта с антигеном указывал на потерю авидности (фигура 11), то репарацию каркасной области осуществляли, как описано ниже.

Для выявления роли положений каркасных остатков в связывании димера с антигеном, конструировали вариант, имеющий положения «всех остатков каркасной области», в котором потенциально важные положения остатков мышинной каркасной области были включены в МА79b HVR-связанное «гуманизированное» антитело (huMA79b-гибрид). Такой вариант (называемый на фигуре 12 вариантом, имеющим «все остатки каркасной области»), не содержащий каких-либо модификаций в HVR, обладал димерной аффинностью связывания, аналогичной аффинности связывания с химерным антителом МА79b (chMA79b) (фигура 12), как было определено с помощью

анализа Biacore и анализа Скэтчарда.

IgG-варианты, включающие мышинные каркасные остатки в положениях 4 и/или 47 (VL) и/или в положениях 47, 48, 67, 69, 71, 73, 74, 78 и/или 80 (VH), получали в целях определения минимального набора положений каркасной области, необходимого для

5 сохранения высокой аффинности связывания с димером (фигура 12). Остатки мышинной каркасной области представлены на фигурах 7A-B (SEQ ID NO: 10) и на фигурах 8A-B (SEQ ID NO: 14). Было обнаружено, что положения каркасной области 47 в VL и 75 и 80 в VH не играют важной роли, как показал анализ MA79b-связанного варианта «гуманизированного антитела» 17 (huMA79b.v17) (фигура 12, ряд, обозначенный 17).

10 MA79b-связанный вариант «гуманизированного антитела» 18 (huMA79b.v18; фигура 12, ряд, обозначенный 18), который включает остатки мышинной каркасной области в положениях 4 в VL и 48, 67, 69, 71, 73 и 78 в VH, а также замены в HVR-H3 (обозначенные на фигуре 12, как “H3-10”, и описанные выше, как мутация H3-10), включая V98I, Y99R и F100L, обнаруживают дополнительное 2-кратное увеличение (фигура 12, ряд,

15 обозначенный 28) уровня связывания с димером по сравнению с вариантом 17 (фигура 12, ряд, обозначенный 17).

Во избежании возможных трудностей, возникающих при получении этих антител, потенциальный сайт, образующий изоаспарагиновую кислоту (Asp-Gly) в HVR-L1 MA79b-связанных вариантов «гуманизированного антитела», удаляли путем

20 превращения D28 в Glu (глутаминовую кислоту) (D28E; см. вариант 28; также обозначенный здесь, как “huMA79b.v28”; фигура 12, ряд, обозначенный 28).

Допустимыми также являются и другие замены, которые могут быть введены для придания стабильности VL MA79b-связанных вариантов «гуманизированного антитела», включая замену D28 на Ser (серин) (D28E; см. вариант 32; также обозначенный здесь

25 “huMA79b.v32”; фигура 12, ряд, обозначенный 32).

MA79b-связанный вариант «гуманизированного антитела» 28 (huMA79b.v28; фигура 12, ряд, обозначенный 28), который включает: (1) остатки мышинной каркасной области в положениях 4 в VL и 48, 67, 69, 71, 73 и 78 в VH, а также включает (2) замены в HVR-H3 (обозначенные на фигуре 12, как “H3-10”, и описанные выше, как мутация H3-10),

30 включая V98I, Y99R и F100L, и, кроме того, включает: (3) замены в HVR-L1 (D28E, описанный выше), был охарактеризован с помощью анализа Biacore.

MA79b-связанный вариант «гуманизированного антитела» 32 (huMA79b.v32; фигура 12, ряд, обозначенный 32), который включает: (1) остатки мышинной каркасной области в положениях 4 в VL и 48, 67, 69, 71, 73 и 78 в VH, а также включает (2) замены в HVR-H3 (обозначенные на фигуре 12, как “H3-10”, и описанные выше, как мутация H3-10),

35 включая V98I, Y99R и F100L, и, кроме того, включает: (3) замены в HVR-L1 (D28S, описанный выше), был охарактеризован с помощью анализа Biacore.

а. Определение аффинности (анализ Biacore)

Как показано на фигуре 12, иллюстрирующей анализ Biacore, данный метод репарации

40 каркасной цепи позволяет идентифицировать множество замен в отдельной последовательности, которые повышают аффинность связывания гибрида «MA79b-гуманизированное антитело» с huCD79b_{ecd}. Анализы, проводимые методом поверхностного плазмонного резонанса, показали, что MA79b-связанный вариант «гуманизированного антитела» 28 (huMA79b.v28; с мышинными остатками каркасной

45 области в положениях 4 в VL, 48, 67, 69, 71, 73 и 78 в VH, а также с мутацией H3-10 в HVR-H3 (V98I, Y99R и F100L (также описанный выше) и мутацией D28E в HVR-L1 (введенной для повышения стабильности, см. выше); фигура 12, ряд, обозначенный 28) и MA79b-связанный вариант «гуманизированного антитела» 32 (huMA79b.v32; с

мышинными остатками каркасной области в положениях 4 в VL, 47, 48, 67, 69, 71, 73 и 78 в VH, а также с мутацией H3-10 в HVR-H3 (V98I, Y99R и F100L (также описанной выше) и с мутацией D28S в HVR-L1 (введенной для повышения стабильности, см. выше); фигура 12, ряд, обозначенный 32) обладают аффинностью связывания с

5 иммобилизованным huCD79b_{ecd}, эквивалентной аффинности связывания химерного антитела MA79b (chMA79b) с указанным антигеном, как было определено с помощью анализа Biacore.

б. Определение аффинности (анализ Скэтчарда)

Как было оценено с помощью анализа Скэтчарда, аналогичного анализу Biacore,

10 данный метод репарации каркасной цепи позволяет идентифицировать множество замен в отдельной последовательности, которые повышают аффинность связывания гибрида «MA79b-гуманизированное антитело» (huMA79b-гибрид). Анализы на связывание с клетками показали, что аффинность связывания MA79b, MA79b-связанного

15 варианта «гуманизированного» антитела 28 (huMA79b.v28; см. фигуру 12, ряд, обозначенный 28) (полученного в новом формате как IgG) и MA79b-связанного варианта «гуманизированного» антитела 32 (huMA79b.v32; см. фигуру 12, ряд, обозначенный 32) с клетками ВJAB, стабильно экспрессирующими CD79b собакоподобных обезьян и

20 эндогенный человеческий CD79b, имеет величину K_d, составляющую 0,63 нМ (MA79b; K_d=0,63±0,14 нМ), 0,44 нМ (huMA79b.v28; K_d=0,44±0,04 нМ) и 0,24 нМ (huMA79b.v32; K_d=0,24±0,02 нМ), соответственно (данные не приводятся), как было определено с помощью анализа Скэтчарда.

с. Определение уровня связывания (FACS-анализ)

Как было определено с помощью FACS-анализа, данный метод репарации каркасной цепи позволяет идентифицировать множество замен в отдельной последовательности,

25 которые повышают уровень связывания гибрида «MA79b-гуманизированное антитело» (MA79b-гибрида) с клетками ВJAB, содержащими люциферазу (данные не приводятся). В частности, FACS-анализ IgG-вариантов MA79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела (вариантов huMA79b.v28 и huMA79b.v32) с клетками ВJAB, содержащими люциферазу, выявил связывание с указанными клетками ВJAB,

30 содержащими люциферазу (данные не приводятся).

В. Обсуждение продуцирования гуманизированных анти-CD79b антител

Для идентификации замен в HVR 1-6, которые повышают аффинность связывания, была проведена репарация CDR путем присоединения 6 мышинных HVR MA79b (определенных как положения 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) и

35 93-102 (H3)) к человеческой консенсусной последовательности VL каппа I и VH подгруппы III (содержащие A71, T73 и A78). Замены в последовательности HVR, идентифицированные на фигуре 10 и 11, или комбинации этих замен приводят к образованию гуманизированных вариантов MA79b с аффинностью, аналогичной аффинности MA79b.

40 Альтернативно репарация каркасной области была применена для повторного «захвата» авидности связывания с димером путем добавления остатков каркасной области 4 в VL и 48, 67 и 69 в VH к huMA79b-гибриду (который включает мышинные остатки каркасной области в положениях 71, 73 и 78 VH) (фигура 12; MA79b-связанный вариант «гуманизированного» антитела 17 (huMA79b.v17)). Аффинность связывания

45 вариантов с заменами в каркасной области антитела против антигена huCD79b_{ecd} была также дополнительно увеличена путем введения 3 замен в HVR-H3: V98I, Y99R и F100L (фигура 12; MA79b-связанный вариант «гуманизированного» антитела 18 (huMA79b.v18)). Потенциальный сайт образования изоаспарагиновой кислоты в HVR-L1 был удален

путем введения мутации D28E (фигура 12; МА79b-связанный вариант «гуманизированного» антитела 28 (huMA79b.v28)).

Пример 2: Получение конъюгатов «анти-CD79b антитело-лекарственное средство» (ADC)

Для анализа эффективности IgG-вариантов МА79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела, указанные МА79b-связанные варианты «гуманизированного» антитела конъюгировали с лекарственными средствами, такими как DM1. Вариантами, конъюгированными с DM1, являются варианты, имеющие замены в HVR-L2 и HVR-H3 (huMA79b L2/H3), huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 и huMA79b.v32.

Лекарственными средствами, используемыми для получения конъюгатов «анти-CD79b антитело-лекарственное средство» (ADC), являются майтанзиноид DM1 и производные доластатина 10, а именно монометилауристатин Е (ММАЕ) и монометилауристатин F (ММАF). (заявки США 2005/0276812; 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), которые полностью вводятся в настоящее описание посредством ссылки). Линкерами, используемыми для получения ADC, являются BMPEO, SPP или SMCC (также обозначаемый здесь «MCC») для DM1 и MC или MC-vc-PAВ для ММАЕ и ММАF. В случае DM1, антитела присоединяли к тио-группе DM1 посредством ε-аминогруппы лизина с использованием линкерного реагента SMCC. Альтернативно, в случае DM1, антитела присоединяли к DM1 посредством ε-аминогруппы лизина с использованием линкера SPP. SPP (N-сукцинимидил-4-(2'-пиридилдитио)пентаноат) реагирует с ε-аминогруппой лизина с образованием реакционноспособного 2-пиридилдисульфидного линкера на белке. Под действием линкеров SPP, после реакции взаимодействия со свободным сульфгидрилом (например, DM1), пиридилная группа удаляется, в результате чего образуется DM1, присоединенный посредством восстанавливаемой дисульфидной связи. DM1, присоединенный посредством линкера SPP, высвобождается в восстанавливающих условиях (то есть, например, в клетках), а DM1, присоединенный посредством линкера SMCC, является резистентным к расщеплению в условиях восстановления. Кроме того, ADC SMCC-DM1 индуцирует клеточную токсичность в случае, если ADC является интернализированным и доставляется в лизосому с высвобождением лизин-N^ε-DM1, который представляет собой эффективный антимитотический агент, присутствующий в клетках, а при его высвобождении из клеток, лизин-N^ε-DM1 становится нетоксичным (Erickson et al., Cancer Res., 66:4426-4433 (2006)). В случае ММАЕ и ММАF антитела были присоединены к ММАЕ или ММАF посредством цистеина через малеимидокапроил-валин-цитруллин-(vc)-п-аминобензилоксикарбонил (MC-vc-PAВ). В случае ММАF эти антитела были альтернативно присоединены к ММАF посредством цистеина через малеимидокапроильный (MC) линкер. MC-vc-PAВ-линкер расщепляется межклеточными протеазами, такими как катепсин В, и после расщепления высвобождается свободное лекарственное средство (Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21:778-784 (2003)), а линкер MC является резистентным к расщеплению внутриклеточными протеазами.

Конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (ADC) для анти-CD79b антитела получали с использованием SMCC и DM1 в соответствии с процедурой, описанной в заявке US 2005/0276812. После очистки анти-CD79b антител проводили буферный обмен с введением раствора, содержащего 50 мМ фосфата калия и 2мМ EDTA, pH 7,0. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) растворяли в диметилацетамиде (DMA) и добавляли к раствору антитела для получения конечного молярного отношения SMCC/Ab=10:1.

Реакцию проводили в течение трех часов при комнатной температуре с перемешиванием. SMCC-модифицированное антитело затем очищали на обессоливающей колонке GE Healthcare HiTrap (G-25), уравновешенной в 35 мМ цитрате натрия с 150 мМ NaCl и 2 мМ EDTA, pH 6,0. DM1, растворенный в DMA, добавляли к SMCC-препарату антитела с получением молярного отношения DM1 к антителу 10:1. Реакцию проводили в течение 4-20 часов при комнатной температуре с перемешиванием. Раствор DM1-модифицированного антитела подвергали диафильтрации 20 объемами PBS для удаления непрореагировавшего DM1, а затем стерильной фильтрации и хранили при 4°C. Обычно при проведении такой процедуры выход антитела составлял 40-60%. Данный препарат обычно более чем на 95% был мономерным, как было оценено с помощью гель-фильтрации и методом рассеяния света на лазере. Поскольку максимальное поглощение DM1 наблюдалось при 252 нм, то количество лекарственного средства, связанного с антителом, может быть определено путем измерения уровня дифференциального поглощения при 252 и 280 нм. Обычно отношение лекарственного средства к антителу составляло 3:4.

Описанные здесь конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (ADC) для анти-CD79b антител могут быть получены с использованием линкеров SPP-DM1 в соответствии с процедурой, описанной в заявке US 2005/0276812. После очистки анти-CD79b антител проводили буферный обмен с введением раствора, содержащего 50 мМ фосфа калия и 2мМ EDTA, pH 7,0. SPP (Immunogen) растворяли в DMA и добавляли к раствору антитела для получения конечного молярного отношения SPP/Ab=10:1, при этом точное отношение зависит от нужной загрузки лекарственного средства в антитело. Исходя из отношения 10:1, можно получить отношение лекарственного средства к антителу, составляющее приблизительно 3-4. SPP оставляли для реакции на 3-4 часа при комнатной температуре с перемешиванием. SPP-модифицированное антитело затем очищали на обессоливающей колонке GE Healthcare HiTrap (G-25), уравновешенной в 35 мМ цитрате натрия с 150 мМ NaCl и 2 мМ EDTA, pH 6,0, или забуференным фосфатом физиологическим раствором, pH 7,4. DM1 растворяли в DMA и добавляли к SPP-препарату антитела с получением молярного отношения DM1 к антителу 10:1, которое дает 3-4-кратный молярный избыток по сравнению с SPP-линкерами, присутствующими на антителе. Реакцию с DM1 проводили в течение 4-20 часов при комнатной температуре с перемешиванием. Раствор DM1-модифицированного антитела подвергали диафильтрации 20 объемами PBS для удаления непрореагировавшего DM1, а затем стерильной фильтрации и хранили при 4°C. Обычно при проведении такой процедуры выход антитела составлял 40-60%. Данный конъюгат «антитело-лекарственное средство» обычно более чем на 95% был мономерным, как было оценено с помощью гель-фильтрации и методом рассеяния света на лазере. Количество связанного лекарственного средства определяли путем измерения уровня дифференциального поглощения при 252 и 280 нм, как описано для получения конъюгатов SMCC-DM1 (как описано выше).

Описанные здесь конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (ADC) для анти-CD79b антител могут быть также получены с использованием соединений «лекарственное средство-линкер», а именно MC-MMAF, MC-MMAE, MC-val-cit(vc)-PAB-MMAE или MC-val-cit(vc)-PAB-MMAF, в соответствии с процедурой, описанной в заявке США 2005/0238649. Очищенное анти-CD79b антитело растворяли в 500 мМ бората натрия и 500 мМ хлорида натрия при pH 8,0, а затем обрабатывали избытком 100 мМ дитиотреитола (DTT). После инкубирования при 37°C в течение примерно 30 минут, буфер заменяли путем элюирования на смоле Sephadex G25, и смесь элюировали PBS с использованием 1 мМ DTPA. Величину тиола/Ab оценивали путем определения концентрации

восстановленного антитела, исходя из оптической плотности раствора 280 нм, и концентрации тиола посредством реакции с DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI), а также определения оптической плотности при 412 нм. Восстановленное антитело растворяли в PBS и охлаждали на льду. Конъюгат «лекарственное средство-линкер», например, MC-val-cit(vc)-PAB-MMAE, в ДМСО, растворяли в ацетонитриле и воде, а затем добавляли к охлажденному восстановленному антителу в PBS. После инкубирования в течение 1 часа добавляли избыток малеимида для гашения реакции, и любые тиоловые группы непрореагировавшего антитела кэпировали. Реакционную смесь концентрировали путем центрифужной ультрафильтрации, а затем конъюгат «антитело-лекарственное средство» очищали и обессоливали путем элюирования через смолу G25 в PBS, после чего фильтровали через 0,2-мкм фильтры в стерильных условиях и замораживали для хранения.

Конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (полученные с использованием описанных здесь анти-CD79b антител) разводили при 2×10 мкг/мл в аналитической среде. Конъюгаты были присоединены посредством перекрестно-связывающих линкеров SMCC (для присоединения SPP к майтанзиноидному токсину DM1 может быть использован альтернативный дисульфидный линкер)(см. заявку US 2005/0276812 и US 2005/0238649). Кроме того, конъюгаты могут быть связаны посредством MC-валин-цитруллин-(vc)-PAB или MC с производными доластатина 10, токсином монометилауристатином E (MMAE) или токсином монометилауристатином F (MMAF) (см. заявку на патент США № 11/141344, поданную 31 мая 2005 г., и заявку на патент США № 10/983340, поданную 5 ноября 2004 г.). Негативный контроль включает конъюгаты на основе HERCEPTIN® (трастузумаба) (анти-HER2 антитела) (SMCC-DM1 или SPP-DM1 или MC-vc-MMAE или MC-vc-MMAF). Позитивный контроль может включать свободный L-DM1, эквивалентный нагрузочной дозе конъюгата. Образцы, перед их разведением, интенсивно перемешивали для гарантии получения гомогенной смеси.

Анти-CD79b антителами для их конъюгирования с лекарственным средством являются химерные антитела MA79b (chMA79b) и вариант L2/H3 антитела huMA79b, а также описанные здесь варианты huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 и huMA79b.v32 (см. пример 1). Другими антителами для конъюгирования могут быть любые описанные здесь антитела (см. пример 1).

Пример 3: Анализ in vivo на уничтожение опухолевых клеток

А. Ксенотрансплантаты

Для анализа эффективности IgG-вариантов MA79b-связанных вариантов «гуманизированного» антитела, имеющего замены в HVR-L2 и HVR-H3 (huMA79b L2/H3), вариант huMA79b L2/H3 конъюгировали с DM1, и анализировали влияние конъюгированного варианта на опухоли у мышей.

В частности, может быть проанализирована способность антител обеспечивать регрессию опухолей во многих моделях ксенотрансплантатов, включая клетки RAMOS, клетки BJAB (клеточную линию лимфомы Беркитта, которая содержит транслокацию t(2;8)(p112;q24) (IGK-MYC), мутированный ген P53, и которая является негативной по вирусу Эпштейна-Барра (EBV)) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), клетки Granta 519 (клеточную линию лимфомы клеток коры головного мозга, которая содержит: транслокацию t(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH), приводящую к сверхэкспрессии циклина D1 (BCL1); делеции P16INK4B и P16INK4A и является EBV-позитивной) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), клетки U698M (B-клеточную линию лимфобластной

лимфосаркомы; (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001) и клетки DoHH2 (клеточную линию фолликулярной лимфомы, содержащую транслокацию, ответственную за развитие фолликулярной лимфомы, а именно t(14;18)(q32;q21), которая приводит к сверхэкспрессии Bcl-2, регулируемой тяжелой цепью Ig; делецию P16INK4A, и транслокацию t(8;14)(q24;q32) (IGH-MYC), а также является EBV-негативной) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)).

Для анализа на эффективность MA79b-связанных вариантов «гуманизированного антитела», самкам мышей CB17 ICR SCID (в возрасте 6-8 недель, поставляемым лабораторией Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) подкожно инокулировали 2×10^7 клеток BJAB, содержащих люциферазу, или клеток Granta-519 путем инъекции в бока мышей CB17 ICR SCID, и этих мышей оставляли до тех пор, пока средний размер опухолевых трансплантатов не достигал 200 мм^2 . День 0 означает день, на который размер опухоли составлял в среднем 200 мм^2 и в который была введена первая или только одна доза, вводимая при данной обработке, если это конкретно не оговорено ниже. Объем опухоли, выражаемый в мм^3 , измеряли штангенциркулем по двум параметрам и вычисляли по формуле: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где a и b означают большой и малый диаметры опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, выражали как среднее \pm ср. кв. от. Группам из 10 мышей вводили одну внутривенную (i.v.) дозу 50-210 мкг связанного с антителом лекарственного средства/м² мыши (соответствующую 1-4 мг/кг мыши), а именно, были введены конъюгаты «вариант MA79b-связанного гуманизированного антитела или контрольного антитела-лекарственное средство». Во время всего эксперимента опухоли измеряли один или два раза в неделю. Массу тела мышей измеряли один или два раза в неделю во время всего эксперимента. Когда объем опухоли достигал 3000 мм^3 или когда опухоли обнаруживали угрожающие жизни признаки изъязвления, мышей подвергали эвтаназии. Все протоколы по экспериментам на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC).

Используемыми линкерами, связывающими антитело и токсин, являются тиоэфирный перекрестно-связывающий линкер SMCC, связывающийся с DM1. Другими линкерами могут быть дисульфидный линкер SPP или тиоэфирный перекрестно-сшивающий линкер SMCC для DM1 или MC или MC-валин-цитруллин(vc)-PAB или дипептидный линкерный реагент (валин-цитруллин(vc)), имеющий малеимидный компонент и пара-аминобензилкарбамоильный (PAB) самоэлиминирующийся компонент для монометилауристатина E (MMAE) или монометилауристатина F (MMAF). Используемыми токсинами являются DM1. Дополнительными токсинами могут быть MMAE или MMAF.

Анти-CD79b антителами, используемыми в данном эксперименте, являются химерные антитела MA79b (chMA79b), описанные в заявке на патент США № 11/462336, поданной 3 августа 2006 г., а также описанные здесь MA79b-связанные варианты «гуманизированного» антитела (см. пример 1A). Другими антителами могут быть коммерчески доступные антитела, включая анти-CD79b антитело, и моноклональные антитела MA79b, полученные от гибридом, депонированных в ATCC как HB11413 20 июля 1993 г.

Негативный контроль включает конъюгаты на основе анти-HER2 антитела (HERCEPTIN® (трастузумаба))(SMCC-DM1).

В. Результаты

1. Ксенотрансплантаты ВJAB, содержащие люциферазу

После проведения 35-дневного курса лечения конъюгатом лекарственных средств в дозах, указанных в таблице 9, а именно МА79b-связанного варианта гуманизированного антитела L2/H3 (варианта huMA79b L2/H3) (полученного в новом формате, IgG) и химерного анти-CD79b антитела (chMA79b), конъюгированного с DM1 (huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 и chMA79b-SMCC-DM1, соответственно), было выявлено ингибирование роста опухолей ВJAB, содержащих люциферазу, у мышей SCID по сравнению с негативным контролем, а именно антителом HERCEPTIN® (трастузумаб) -SMCC-DM1 (анти-HER2-SMCC-DM1). Для всех ADC и контроля вводили одну дозу ADC (как показано в таблице 9) на день 0. В частности, L2/H3-SMCC-DM1-антитела huMA79b (полученные в новом формате как IgG) и chMA79b-SMCC-DM1 значительно ингибировали рост опухоли (фигура 20). Кроме того, в таблице 9 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³).

Таблица 9					
Вводимое антитело (обработка)	PR	CR	Доза «лекарственное средство - DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	Отношение (Лекарственное средство/ Ab)
Контроль анти-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. Ксенотрансплантаты Granta-519

После проведения 14-дневного курса лечения конъюгатом лекарственных средств в дозах, указанных в таблице 10, а именно МА79b-связанного варианта гуманизированного антитела, а именно варианта 17, варианта 18, варианта 28 и варианта 32 (huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 и huMA79b.v32, соответственно) (полученных в новом формате как IgG) и химерного анти-CD79b антитела (chMA79b), конъюгированного с DM1 (huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1, huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1 и chMA79b-SMCC-DM1, соответственно), было выявлено ингибирование роста опухолей Granta-519 у мышей SCID по сравнению с негативным контролем, а именно антителом HERCEPTIN® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (анти-HER2-SMCC-DM1). Для всех ADC и контроля вводили одну дозу ADC (как показано в таблице 9) на день 0. В частности, антитела huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1 и huMA79b.v18-SMCC-DM1 (полученные в новом формате как IgG) и chMA79b-SMCC-DM1 значительно ингибировали рост опухоли (фигура 21А).

Кроме того, обработка антителами huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1 и chMA79b-SMCC-DM1, и контрольным антителом HERCEPTIN® (трастузумаб)-SMCC-DM1 (анти-HER2-SMCC-DM1) не приводила к снижению процента массы тела мышей (фигура 21В). Более того, в таблице 10 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой

период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³).

Таблица 10

Вводимое антитело (обработка)	PR	CR	Доза «лекарственное средство - DM1» (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	Отношение (Лекарственное средство/Ab)
Контроль анти-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

Исходя из способности ADC «MA79b-связанное гуманизированное антитело» значительно ингибировать прогрессирование опухоли в ксенотрансплантате, можно сказать, что молекулы CD79b могут служить превосходной мишенью для лечения опухолей у млекопитающих, включая В-клеточно-ассоциированные раковые опухоли, такие как лимфомы (то есть неходжкинская лимфома), лейкоз (то есть хронический лимфоцитарный лейкоз) и другие раковые опухоли гемопоэтических клеток. Кроме того, MA79b-связанные гуманизированные ADC могут быть использованы для снижения роста опухолей *in vivo*, включая В-клеточно-ассоциированные раковые опухоли, такие как лимфомы (то есть неходжкинская лимфома), лейкоз (то есть хронический лимфоцитарный лейкоз) и другие раковые опухоли гемопоэтических клеток.

Пример 4: Солокализация анти-CD79b антитела

Для того чтобы определить участок доставки MA79b-связанных гуманизированных антител и их вариантов после интернализации в клетку, могут быть проведены исследования по солокализации анти-CD79b антител, интернализованных в В-клеточные линии, а именно в клеточные линии Ramos. LAMP-1 представляет собой маркер для поздних эндосом и лизосом (Kleijmeer et al., Journal of Cell Biology, 139(3):639-649 (1997); Hunziker et al., Bioessays, 18:379-389 (1996); Mellman et al., Annu. Rev. Dev. Biology, 12:575-625 (1996)), включая компартменты МНС класса II (МПС), которые представляют собой компартмент, подобный поздней эндосоме/лизосоме. HLA-DM представляет собой маркер для МПС.

Клетки Ramos инкубировали в течение 3 часов при 37°C с 1 мкг/мл MA79b-связанных гуманизированных антител и их вариантов с FcR-блоком (Miltenyi) и 25 мкг/мл Alexa647-трансферрина (Molecular Probes) в полной не содержащей карбоната среде (Gibco) в присутствии 10 мкг/мл лейпептина (Roche) и 5 мкМ пепстатина (Roche) для ингибирования разложения лизосом. Затем клетки два раза промывали, фиксировали 3% параформальдегидом (Electron Microscopy Sciences) в течение 20 минут при комнатной температуре, гасили 50 мМ NH₄Cl (Sigma), и делали проницаемыми с использованием 0,4% сапонины/2% FBS/1% BSA в течение 20 минут, после чего инкубировали с 1 мкг/мл антитела против мышинового Cy3 (Jackson ImmunoResearch) в течение 20 минут. Затем реакцию блокировали в течение 20 минут мышинным IgG (Molecular Probes), а затем смесь инкубировали в течение 30 минут с усилителем сигнала Image-iT FX (Molecular Probes). И наконец, клетки инкубировали с Zenon Alexa488-меченым мышинным антителом против LAMP1 (BD Pharmingen), маркером для лизосом и МПС (лизосомо-подобным компартментом, который является частью пути МНС класса II), в течение 20 минут, а

затем фиксировали 3% PFA. Клетки ресуспендировали в 20 мкл сапонинового буфера и оставляли для адгезии на предметных стеклах, покрытых полилизинном (Sigma), а затем помещали на покровное стекло с использованием DAPI-содержащего вектора VectaShield (Vector Laboratories). Для иммунофлуоресценции МПС или лизосом, клетки фиксировали, делали проницаемыми, и сигнал усиливали, как описано ниже, после чего подвергали совместному окрашиванию меченным Zenon Alexa555-HLA-DM (BD Pharmingen) и Alexa488-Lamp1 в присутствии избытка мышинового IgG в соответствии с инструкциями производителей (Molecular Probes).

В соответствии с этим, солокализация МА79b-связанных гуманизированных антител или их вариантов с МПС или лизосомами В-клеточных линий, как было оценено с помощью иммунофлуоресценции, может указывать на то, что данные молекулы являются превосходными средствами для лечения опухолей у млекопитающих, включая В-клеточно-ассоциированные раковые опухоли, такие как лимфомы (то есть неходжкинская лимфома), лейкоз (то есть хронический лимфоцитарный лейкоз) и другие раковые опухоли гемопоэтических клеток.

Пример 5: Получение сконструированных на основе цистеина анти-CD79b антител

Сконструированные на основе цистеина анти-CD79b антитела получали, как описано в настоящей заявке.

ДНК, кодирующую антитело МА79b (легкую цепь, SEQ ID NO: 4, фигура 4; и тяжелую цепь, SEQ ID NO: 5, фигура 5), подвергали мутагенезу описанными здесь методами для модификации легкой и тяжелой цепи. ДНК, кодирующая антитело МА79b (тяжелую цепь, SEQ ID NO: 5; фигура 5), может быть также подвергнута мутагенезу описанными здесь методами для модификации Fc-области тяжелой цепи.

ДНК, кодирующую антитело huMA79b.v17 (тяжелую цепь, SEQ ID NO: 304, фигура 15), подвергали мутагенезу описанными здесь методами для модификации тяжелой цепи. ДНК, кодирующая антитело huMA79b.v17 (легкую цепь, SEQ ID NO: 303; фигура 15; и тяжелую цепь SEQ ID NO: 304; фигура 15), может быть также подвергнута мутагенезу описанными здесь методами для модификации легкой цепи или Fc-области тяжелой цепи.

ДНК, кодирующую антитело huMA79b.v18 (тяжелую цепь, SEQ ID NO: 306, фигура 16), подвергали мутагенезу описанными здесь методами для модификации тяжелой цепи. ДНК, кодирующая антитело huMA79b.v18 (легкую цепь, SEQ ID NO: 305; фигура 16; и тяжелую цепь SEQ ID NO: 306; фигура 16), может быть также подвергнута мутагенезу описанными здесь методами для модификации легкой цепи или Fc-области тяжелой цепи.

ДНК, кодирующую антитело huMA79b.v28 (тяжелую цепь, SEQ ID NO: 308, фигура 17), подвергали мутагенезу описанными здесь методами для модификации тяжелой цепи. ДНК, кодирующая антитело huMA79b.v28 (легкую цепь, SEQ ID NO: 307; фигура 17; и тяжелую цепь SEQ ID NO: 308; фигура 17), может быть также подвергнута мутагенезу описанными здесь методами для модификации легкой цепи или Fc-области тяжелой цепи.

ДНК, кодирующая антитело huMA79b.v32 (легкую цепь, SEQ ID NO: 310; фигура 18; и тяжелую цепь SEQ ID NO: 309; фигура 18), может быть также подвергнута мутагенезу описанными здесь методами для модификации легкой цепи и тяжелой цепи.

ДНК, кодирующую антитело против CD79b собакоподобных обезьян (легкую цепь, SEQ ID NO: 241, фигура 45; и тяжелую цепь, SEQ ID NO: 243, фигура 47), подвергали мутагенезу описанными здесь методами для модификации легкой и тяжелой цепи. ДНК, кодирующая антитело против CD79b собакоподобных обезьян (тяжелую цепь, SEQ ID

NO: 243; фигура 47), может быть также подвергнута мутагенезу описанными здесь методами для модификации Fc-области тяжелой цепи.

Для получения сконструированных на основе цистеина анти-CD79b антител ДНК, кодирующую легкую цепь, подвергали мутагенезу путем замены валина цистеином в положении 205 по Кэбату в легкой цепи (положение 209 в соответствии с последовательной нумерацией), как показано на фигуре 27 (легкая цепь SEQ ID NO: 235 тию-MAb MA79b) и на фигуре 49 (легкая цепь SEQ ID NO: 300 тию-MAb против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10)). ДНК, кодирующую тяжелую цепь, подвергали мутагенезу путем замены аланина цистеином в тяжелой цепи в положении 118 в соответствии с Европейской нумерацией (положение 118 в соответствии с последовательной системой нумерации; номер 114 по Кэбату), как показано на фигуре 48 (тяжелая цепь SEQ ID NO: 244 тию-Mab-антитела против CD79b собакоподобных обезьян (ch10D10)), на фигуре 28 (тяжелая цепь SEQ ID NO: 236 тию-Mab MA79b), на фигуре 24 (тяжелая цепь SEQ ID NO: 228 тию-MAb huMA79b.v17), на фигуре 25 (тяжелая цепь SEQ ID NO: 230 тию-MAb huMA79b.v18) и на фигуре 26 (тяжелая цепь SEQ ID NO: 232 тию-MAb huMA79b.v28). Fc-область анти-CD79b антител может быть подвергнута мутагенезу путем замены серина цистеином в положении 400 в Fc-области тяжелой цепи в соответствии с Европейской системой нумерации (положение 400 в соответствии с последовательной нумерацией; номер по Кэбату-396), как показано в таблице 2-4.

А. Получение сконструированных на основе цистеина анти-CD79b антител для конъюгирования путем восстановления и повторного окисления

Полноразмерные, сконструированные на основе цистеина анти-CD79b моноклональные антитела (тиоMab) экспрессировали в клетках CHO и очищали путем проведения аффинной хроматографии на белке А, а затем эксклюзионной хроматографии. Очищенные антитела разводили в 500 мМ бората натрия и 500 мМ хлорида натрия при pH примерно 8,0, а затем восстанавливали приблизительно 50-100-кратным молярным избытком 1 мМ TCEP (гидрохлорида трис(2-карбоксиил)фосфина; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) в течение примерно 1-2 часов при 37°C. Восстановленный тию-Mab разводили и загружали на колонку HiTrap S в 10 мМ ацетата натрия, pH 5, и элюировали PBS, содержащим 0,3 М хлорида натрия. Элюированный восстановленный тию-Mab обрабатывали 2 мМ дегидроаскорбиновой кислоты (dhAA) при pH 7 в течение 3 часов или 2 мМ водного сульфата меди (CuSO₄) при комнатной температуре в течение ночи. Может также оказаться эффективным окисление на воздухе. Буфер заменяли путем элюирования на смоле Sephadex G25, и смесь элюировали PBS с использованием 1 мМ DTPA. Величину тиола/Ab вычисляли путем определения концентрации восстановленного антитела, исходя из оптической плотности раствора при 280 нм и концентрации тиола путем проведения реакции взаимодействия с DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI), и определения оптической плотности при 412 нм.

Пример 6: Получение конъюгатов «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» путем проведения реакции конъюгирования сконструированных на основе цистеина анти-CD79b антител с промежуточными соединениями «лекарственное средство-линкер»

После процедур восстановления и повторного окисления, описанных в примере 5, сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело разводили в PBS-буфере (в забуференном фосфатом физиологическом растворе) и охлаждали на льду. Приблизительно 1,5 молярных эквивалентов промежуточного соединения «ауристатиновое лекарственное средство-линкер», такого как MC-MMAE

(малеимидакапроил-монометилауристатин E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE или MC-val-cit-PAB-MMAF, содержащих реагирующую с тиолом функциональную группу, такую как малеимида, по отношению к цистеинам, введенным в антитело, растворяли в ДМСО, разводили в ацетонитриле и воде и добавляли к охлажденному

восстановленному и повторно окисленному антителу в PBS. Примерно через один час добавляли избыток малеимида для гашения реакции, и любые непрореагировавшие тиоловые группы антитела эпировали. Реакционную смесь концентрировали путем центрифужной ультрафильтрации, а затем конъюгат «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» очищали и обессоливали путем элюирования через смолу G25 в PBS, после чего фильтровали через 0,2-мкм фильтры в стерильных условиях и замораживали для хранения.

Получение тимоАб-ВМРЕО-DM1 huMA79b.v18-NC(A118C) осуществляли следующим образом. Свободный цистеин на huMA79b.v18-NC(A118C) тимо-Аб модифицировали бис-малеимида-реагентом ВМ(РЕО)₃ (Pierce Chemical), в результате чего

непрореагировавшая малеимида-группа оставалась на поверхности антитела. Это осуществляли путем растворения ВМ(РЕО)₃ в 50% смеси этанола/воды до достижения концентрации 10 мМ и добавления 10-кратного молярного избытка ВМ(РЕО)₃ в раствор, содержащий тимо-Аб huMA79b.v18-NC(A118C) в забуференном фосфатом физиологическом растворе в концентрации приблизительно 1,6 мг/мл (10 микромоляр), а затем оставляли на 1 час для прохождения реакции. Избыток ВМ(РЕО)₃ удаляли путем гель-фильтрации (на колонке HiTrap, Pharmacia) в 30 мМ цитрата, pH 6, в присутствии 150 мМ NaCl-буфера. Приблизительно 10-кратный избыток DM1, растворенный в диметилацетамиде (DMA), добавляли к промежуточному соединению тимо-Аб-ВМРЕО huMA79b.v18-NC(A118C). Для растворения реагента, а именно молекулы лекарственного средства, может быть также использован диметилформамид (DMF). Реакционную смесь оставляли на ночь для прохождения реакции, а затем подвергали гель-фильтрации или диализу в PBS для удаления непрореагировавшего лекарственного средства. Гель-фильтрацию на колонках S200 в PBS проводили для удаления высокомолекулярных агрегатов и загружали очищенное тимо-Аб-ВМРЕО-DM1 huMA79b.v18-NC(A118C).

В соответствии с теми же самыми протоколами получали контрольное тимо-антитело hu-анти-HER2-NC(A118C)-ВМРЕО-DM1, контрольное тимо-антитело hu-анти-HER2-NC(A118C)-MC-MMAF, контрольное тимо-антитело hu-анти-HER2-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE и контрольное тимо-антитело анти-CD22-NC(A118C)-MC-MMAF.

В соответствии с вышеописанными процедурами были получены и протестированы нижеследующие конъюгаты «сконструированное на основе цистеина анти-CD79b антитело-лекарственное средство» (TDC):

1. тимо-huMA79b.v18-NC(A118C)-MC-MMAF, полученный путем конъюгирования A118C-тимо-huMA79b.v18-NC(A118C) и MC-MMAF;
2. тимо-huMA79b.v18-NC(A118C)-ВМРЕО-DM1, полученный путем конъюгирования A118C-тимо-huMA79b.v18-NC(A118C) и ВМРЕО-DM1;
3. тимо-huMA79b.v18-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE полученный путем конъюгирования A118C-тимо-huMA79b.v18-NC(A118C) и MC-val-cit-PAB-MMAE;
4. тимо-huMA79b.v28-NC(A118C)-MC-MMAF, полученный путем конъюгирования A118C-тимо-huMA79b.v28-NC(A118C) и MC-MMAF;
5. тимо-huMA79b.v28-NC(A118C)-ВМРЕО-DM1, полученный путем конъюгирования тимо-huMA79b.v28-NC(A118C) и ВМРЕО-DM1;
6. тимо-huMA79b.v28-NC(A118C)-MC-val-cit-PAB-MMAE, полученный путем

конъюгирования тио-huMA79b.v28-НС(A118C) и MC-val-cit-PAB-MMAE;

7. тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MC-MMAF, полученный путем конъюгирования A118C-тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C) и MC-MMAF;

8. тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-BMPEO-DM1, полученный путем конъюгирования A118C-тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C) и BMPEO-DM1;

9. тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE, полученный путем конъюгирования A118C-тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C) и MC-val-cit-PAB-MMAE;

10. тио-MA79b-НС(A118C)-MC-MMAF, полученный путем конъюгирования тио-MA79b-НС(A118C) и MC-MMAF; и

11. тио-MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF, полученный путем конъюгирования тио-MA79b-LC(V205C) и MC-MMAF.

Пример 7: Характеризация аффинности связывания конъюгатов «сконструированное на основе цистеина тио-Mab-лекарственное средство» с антигеном клеточной поверхности

Аффинность связывания конъюгатов «тио-huMA79b.v18, тио-huMA79b.v28-лекарственное средство» и конъюгатов «тио-MA79b-лекарственное средство» с CD79b, экспрессируемым на клетках ВJAB, содержащих люциферазу, оценивали с помощью FACS-анализа. Кроме того, аффинность связывания конъюгатов «тио-анти-супоCD79b(ch10D10) антитело-лекарственное средство» с CD79b, экспрессируемым на клетках ВJAB, экспрессирующих CD79b собакоподобных обезьян, определяли с помощью FACS-анализа.

Вкратце, приблизительно 1×10^6 клеток в 100 мкл подвергали контактированию с различными количествами (1,0 мкг, 0,1 мкг или 0,01 мкг Ab на миллион клеток ВJAB, содержащих люциферазу, или клеток ВJAB, экспрессирующих CD79b собакоподобных обезьян (для анти-супоCD79b тио-Mab)) одного из нижеследующих конъюгатов «анти-CD79b тио-Mab-лекарственное средство» или «оголенного» антитела (неконъюгированного Ab, используемого в качестве контроля): (1) тио-MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF или (2) тио-MA79b-НС(A118C)-MC-MMAF (фигуры 29А-В, соответственно); (3) тио-huMA79b.v18-НС(A118C)-MC-MMAF, (4) тио-huMA79b.v18-НС(A118C)-MC-vcPAB-MMAE или (5) тио-huMA79b.v18-НС(A118C)-BMPEO-DM1 (фигуры 30В-Д, соответственно); (6) тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (7) тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1 или (8) тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-MC-MMAF (см. фигуры 31В-31Д, соответственно); или (9) тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (10) тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-BMPEO-DM1 или (11) тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MC-MMAF (см. фигуры 32В-32Д, соответственно). ФЭ-конъюгированное мышинное антитело против человеческих Ig использовали в качестве «второго» детектирующего антитела (BD Cat#555787).

Анти-CD79b антитело, связанное с клеточной поверхностью, детектировали с использованием ФЭ-конъюгированного мышинного антитела против человеческих Ig. На графиках, представленных на фигурах 29-32, показано, что связывание с антигеном является приблизительно одинаковым для всех тестируемых конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство».

Пример 8: Анализ in vitro на снижение пролиферации клеток под действием конъюгатов «анти-CD79b тио-Mab-лекарственное средство»

Эффективность in vitro конъюгатов «анти-CD79b тио-Mab-лекарственное средство» (включая тио-huMA79b.v18-НС(A118C)-MC-MMAF, тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE и тио-huMA79b.v18-НС(A118C)-BMPEO-DM1) определяли с помощью

анализа на пролиферацию клеток (фигура 41A, клетки VJAB, содержащие люциферазу; фигура 41B, Granta-519; фигура 41C, WSU-DLCL2). Люминесцентный анализ на жизнеспособность клеток CellTiter-Glo® является коммерчески доступным (Promega Corp., Madison, WI) и представляет собой специально разработанный анализ, осуществляемый методом рекомбинантной экспрессии люциферазы Coleoptera (US 5583024; US 5674713; US 5700670). В этом анализе на пролиферацию клеток определяют число жизнеспособных клеток в культуре, исходя из количества присутствующего АТР, которое является показателем метаболической активности клеток (Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160:81-88 (1993); US 6602677). Анализ CellTiter-Glo® проводили в 96-луночном формате, что позволяло осуществлять автоматизированный высокоэффективный скрининг (HTS) (Cree et al., AntiCancer Drugs, 6:398-404 (1995)). Процедура такого специально разработанного анализа включает добавление одного реагента (реагента CellTiter-Glo®), который непосредственно добавляют в клетки, культивируемые в среде, содержащей сыворотку.

Процедура, проводимая в формате «добавление-смешивание-измерение», позволяет осуществлять лизис клеток с продуцированием люминесцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующего АТР. Субстрат, люциферин жуков, подвергают окислительному декарбоксилированию под действием рекомбинантной люциферазы светляка с последующим превращением АТР в АМР и генерированием фотонов. Число жизнеспособных клеток соответствует относительным единицам люминесценции (RLU). Данные могут быть зарегистрированы на люминометре или на визуализирующем устройстве, снабженном камерой с ПЗС. Выходной люминесцентный сигнал выражают как RLU, измеряемые в зависимости от времени. % RLU представляет собой процент относительных единиц люминесценции, нормализованный по данным для контроля, то есть, «антитела, которое не было конъюгировано с лекарственным средством». Альтернативно фотоны, генерированные люминесцентным излучением, могут быть подсчитаны в сцинтилляционном счетчике в присутствии сцинтилляционной жидкости. Световые единицы могут быть далее представлены как CPS (число импульсов в секунду).

Эффективность конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство» определяли с помощью анализа на пролиферацию клеток, проводимого в соответствии с протоколом, адаптированным для люминесцентного анализа на жизнеспособность клеток (CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62:5485-5488 (2002)):

1. Аликвоту 40 мл клеточной культуры, содержащей примерно 3000 клеток VJAB, Granta-519 или WSU-DLCL2 в среде, помещали в каждую лунку 384-луночного планшета с непрозрачными стенками.

2. TDC (конъюгат «тио-Mab-лекарственное средство») (10 мкл) добавляли в экспериментальные лунки с четырьмя повторностями до конечной концентрации 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13,7, 4,6 или 1,5 нг/мл, а в контрольные лунки добавляли только среду, не содержащую конъюгата с лекарственным средством, и инкубировали в течение 3 дней.

3. Планшеты уравнивали до комнатной температуры приблизительно в течение 30 минут.

4. Добавляли реагент CellTiter-Glo (50 мкл).

5. Содержимое перемешивали в течение 2 минут на орбитальном шейкере для индуцирования клеточного лизиса.

6. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для

стабилизации люминесцентного сигнала.

7. Люминесценцию регистрировали и на графике выражали в % RLU (относительных единицах люминесценции). По данным, полученным для клеток при 0,51 нг/мл, инкубированных со средой, не содержащей конъюгата с лекарственным средством, строили график.

Среда: клетки VJAB, Granta-519 и WSU-DLCL2 культивировали в среде RPMI1640/10%FBS/2мМ глутамин.

Пример 9: Анализ на ингибирование роста опухоли in vivo с использованием конъюгатов «анти-CD79b тио-Mab-лекарственное средство»

A. Granta-519 (лимфома клеток коры головного мозга человека)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали эффективность конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство» в ксенотрансплантатах Granta-519 (лимфомы клеток коры головного мозга человека) у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 11.

Контрольное Ab представляло собой hu-анти-HER2-MC-MMAF или MA79b-MC-MMAF. Контрольное тио-MAb HC(A118C) представляло собой тио-MAb тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MMAF. Результаты представлены в таблице 11 и на фигуре 33.

На фигуре 33A представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантата Granta-519 у мышей CB17 SCID, которым вводили конъюгат TDC «тяжелая цепь с A118C или легкая цепь с V205C анти-CD79b антитела» в дозах, представленных в таблице 11. В частности, введение тио-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF и тио-chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с негативным контролем (анти-hu-HER2-MC-MMAF и тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). В качестве другого контроля использовали MA79b-MC-MMAF.

Кроме того, в том же исследовании, для каждой группы, которой вводили дозы, определяли процент изменения массы тела за первые 14 дней. Результаты (фигура 33B) показали, что введение этих конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство» не приводило к значительному снижению процента массы тела или к потере массы в течение данного периода времени.

Более того, в таблице 11 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 11
Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тио-chMA79b-HC(A118C) или тио-chMA79b-LC(V205C)MMAF мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами Granta-519

Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAF (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/ Ab)
Контроль hu-анти-HER2-MC-MMAF	0/8	0/8	413	6,8	4,0
Тио-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	191	6,8	1,85
Контроль chMA79b-MC-MMAF	1/8	0/8	100	2,3	3,0
Контроль chMA79b-MC-MMAF	8/9	1/9	300	6,8	3,0

Тео-сhMA79b-НС(A118C)-МС-ММАF	0/8	0/8	63	2,3	1,9
Тео-сhMA79b-НС(A118C)-МС-ММАF	4/9	0/9	190	6,8	1,9
Тео-сhMA79b-LC(V205C)-МС-ММАF	0/8	0/8	60	2,3	1,8
Тео-сhMA79b-LC(V205C)-МС-ММАF	5/9	4/9	180	6,8	1,8

В. Ксенотрансплантаты ВJAB, содержащие люциферазу (лимфомы Беркитта)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали эффективность других конъюгатов лекарственных средств в ксенотрансплантатах ВJAB, содержащих люциферазу (лимфомы Беркитта) у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 12.

Контрольное антитело представляло собой huMA79b.v28 (конъюгированное с SMCC-DM1). Контрольное тео-MAb HC(A118C) представляло собой антитело тео-Mab тео-hu-анти-HER2-НС(A118C) (конъюгированное с BMPEO-DM1, MC-MMAF или MCvcPAB-MMAE), тео-Mab тео-huMA79b.v28-НС(A118C) или тео-Mab тео-hu-анти-CD22(10F4v3)-НС(A118C) (конъюгированное с MC-MMAF). Результаты представлены ниже в таблице 12 и на фигуре 34.

На фигуре 34A представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантатов ВJAB, содержащих люциферазу, у мышей CB17 SCID, обработанных конъюгатами «тео-MAb huMA79b.v28-НС(A118C)-лекарственное средство», как показано в таблице 12. В частности, введение конъюгата тео-Mab, «тео-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тео-huMA79b.v28-НС(A118C)-MC-MMAF и тео-huMA79b.v28-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE-лекарственное средство» приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с ростом опухоли после обработки конъюгатами «антитело-лекарственное средство» (тео-hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тео-hu-анти-HER2-НС(A118C)-MC-MMAF и тео-hu-анти-HER2-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE), используемыми в качестве негативного контроля. Другой контроль представлял собой тео-huMA79b.v28-НС(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 и тео-hu-анти-CD22(10F4v3)-НС(A118C)-MC-MMAF.

Кроме того, в том же исследовании, для каждой группы, которой вводили дозы, определяли процент изменения массы тела за первые 7 дней. Результаты (фигура 34B) показали, что введение этих конъюгатов «тео-Mab-лекарственное средство» не приводило к значительному снижению процента массы тела или к потере массы в течение данного периода времени.

Более того, в таблице 12 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 12 Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тео-HuMA79b.v28-НС(A118C)MMAE, MMAF и DM1 мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами ВJAB, содержащими люциферазу						
Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAE, MMAF или DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/ Ab)	
Тео-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1,86	
Тео-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-MC-	1/10	0/10	58	2	1,9	

MMAF						
Тио-контроль	hu-анти-HER2-HC(A118C)-	0/10	0/10	46	2	1,55
MCvcPAB-MMAE						
Контроль	huMA79b.v28-SMCC-DM1	2/10	3/10	101	2	3,4
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1		3/10	2/10	55	2	1,85
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF		0/10	10/10	57	2	1,95
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE		0/10	10/10	54	2	1,87
Тио-контроль	huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Тио-контроль	hu-анти-CD22(10F4v3)-HC	1/10	4/10	59	2	1,96
(A118C)-MC-MMAF						

С. Ксенотрансплантаты WSU-DLCL2 (диффузной крупноклеточной лимфомы)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали эффективность конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство» в ксенотрансплантатах фолликулярной лимфомы (диффузной крупноклеточной лимфомы) WSU-DLCL2 у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы представлены ниже в таблице 13.

Контрольное антитело представляло собой huMA79b.v28 (конъюгированное с SMCC-DM1). Контрольное тио-MAb NC(A118C) представляло собой антитело тио-Mab тио-hu-анти-HER2-NC(A118C) (конъюгированное с BMPEO-DM1, MC-MMAF или MCvcPAB-MMAE), тио-Mab тио-huMA79b.v28-NC(A118C) или тио-Mab тио-hu-анти-CD22(10F4v3)-NC(A118C) (конъюгированное с MC-MMAF). Результаты представлены ниже в таблице 13.

На фигуре 35A представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантатов WSU-DLCL2 (диффузной крупноклеточной лимфомы) у мышей CB17 SCID, обработанных конъюгатами TDC «тяжелая цепь с A118C анти-CD79b антитела» в дозах, указанных в таблице 13. В частности, введение конъюгата тио-Mab, «тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-MC-MMAF и тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE» приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с ростом опухоли после обработки негативным контролем (тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MC-MMAF и тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), тио-huMA79b.v28-NC(A118C). Другой контроль представлял собой тио-huMA79b.v28-NC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 и тио-hu-анти-CD22(10F4v3)-NC(A118C)-MC-MMAF.

TDC тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, очевидно, является наиболее эффективным из всех тестируемых агентов в данном исследовании.

Кроме того, в том же исследовании, для каждой группы, которой вводили дозы, определяли процент изменения массы тела за первые 7 дней. Результаты (фигура 35B) показали, что введение этих конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство» не приводило к значительному снижению процента массы тела или к потере массы в течение данного периода времени.

Более того, в таблице 13 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 13
Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тио-HuMA79b.v28-HC(A118C)MMAE, MMAF и DM1 мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами WSU-DLCL2

Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAE DM1 (мкг/м ²)	MMAF, или Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/Ab)
Тио-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Тио-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	115	4	1,9
Тио-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	92	4	1,55
Контроль huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/10	0/10	202	4	3,4
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	110	4	1,85
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/10	1/10	115	4	1,95
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	3/10	108	4	1,87
Тио-контроль huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA
Тио-контроль 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	118	4	1,96
Тио-контроль huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA

D. Ксенотрансплантаты DONH2 (фолликулярная лимфома)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали способность конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство» снижать объем В-клеточной опухоли у мышей CB17 SCID с моделью ксенотрансплантатов DONH2. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 14.

Контрольное антитело представляло собой huMA79b.v28 (конъюгированное с SMCC-DM1). Контрольное тио-MAb HC(A118C) представляло собой антитело тио-Mab тио-hu-анти-HER2-HC(A118C) (конъюгированное с BMPEO-DM1, MC-MMAF или MCvcPAB-MMAE), тио-Mab тио-huMA79b.v28-HC(A118C) или тио-Mab тио-hu-анти-CD22-HC(A118C) (конъюгированное с MC-MMAF). Результаты представлены ниже в таблице 12 и на фигуре 36.

На фигуре 36A представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантатов клеток DONH2 у мышей CB17 SCID, обработанных конъюгатами TDC «тяжелая цепь с A118C» в дозах, указанных в таблице 14. В частности, введение конъюгата тио-Mab, «тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF и тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-лекарственное средство» в дозах, указанных в таблице 14, приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с ростом опухоли после обработки конъюгатами «антитело-лекарственное средство» (тио-контроль тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-контроль тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF и тио-контроль тио-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), используемыми в качестве негативного контроля. Другой контроль представлял собой тио-контроль huMA79b.v28-HC(A118C), тио-контроль анти-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF, тио-контроль huMA79b.v28-HC(A118C) и контроль huMA79b.v28-SMCC-DM1.

Более того, в таблице 14 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 14
Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тио-HuMA79b.v28-HC(A118C)DM1, MMAF и MMAE мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами DONH2

Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAF или DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/Ab)
5 Тио-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1,86
Тио-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
10 Тио-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1,55
Контроль huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/8	1/8	202	4	3,4
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/9	1/9	110	4	1,85
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	4/9	115	4	1,95
Тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	9/9	108	4	1,87
Тио- контроль huMA79b.v28-HC(A118C)	1/9	0/9	NA	4	NA
Тио-контроль анти-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	118	4	1,96

Е. Ксенотрансплантаты клеток ВJAB, содержащих люциферазу (лимфомы Беркитта)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами «антитело-лекарственное средство» и с различными их дозами, оценивали эффективность других конъюгатов лекарственных средств в ксенотрансплантатах ВJAB, содержащих люциферазу (лимфомы Беркитта) у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 15.

Контрольное антитело представляло собой носитель (только буфер (для ADC)). Контрольное тио-MAb HC(A118C) представляло собой антитело тио-Mab тио-hu-анти-HER2-HC(A118C) (конъюгированное с BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE или MC-MMAF), тио-Mab тио-huMA79b.v28-HC(A118C) или тио-Mab тио-hu-анти-CD22(10F4v3)-HC(A118C) (конъюгированное с MC-MMAF). Результаты представлены ниже в таблице 15.

На фигуре 37А представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантатов ВJAB, содержащих люциферазу, у мышей CB17 SCID, обработанных TDC «тяжелая цепь с A118C анти-CD79b антитела» в дозах, указанных в таблице 15. В частности, введение «тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE и тио-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF» приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с ростом опухоли после обработки негативным контролем (тио-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, тио-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). Другой контроль представлял собой тио-huMA79b.v28-HC(A118C) и тио-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF.

Более того, в таблице 15 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 15
Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тио-HuMA79b.v28-HC(A118C)MMAE, MMAF и DM1 мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами ВJAB, содержащими люциферазу

Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAF, MMAE или DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/Ab)
-------------------	----	----	---	-----------------	---------------------------------

5	контроль носитель	0/10	0/10	NA	NA	NA
	Тео-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	57	2	1,86
	Тео-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	23	1	1,55
	Тео-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	29	1	1,9
	Тео-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1	2/10	0/10	27	1	1,85
	Тео-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1	4/10	0/10	55	2	1,85
	Тео-huMA79b.v28-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	1/10	27	1	1,9
	Тео-huMA79b.v28-НС(A118C)-MC-MMAF	3/8	1/8	28	1	1,9
	Тео-контроль huMA79b.v28-НС(A118C)	0/10	0/10	NA	1	NA
	Тео-контроль 10F4v3-НС(A118C)-MC-MMAF	0/10	1/10	30	1	1,96

Ф. Ксенотрансплантаты Granta-519 (лимфомы клеток коры головного мозга человека)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали эффективность конъюгатов «тио-MAb-лекарственное средство» в ксенотрансплантатах Granta-519 (лимфомы клеток коры головного мозга человека) у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 16.

Контрольное тию-MAb НС(A118C) представляло собой тию-MAb тию-hu-анти-HER2-НС(A118C) (конъюгированное с BMPEO-DM1 или MC-MMAF). Результаты представлены в таблице 16 и на фигуре 38.

На фигуре 38А представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантата Granta-519 у мышей CB17 SCID, которым вводили конъюгат TDC «тяжелая цепь с A118C анти-CD79b антитела» в дозах, представленных в таблице 16. В частности, введение конъюгатов тию-MAb «тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1 и тию-huMA79b.v28-НС(A118C)-MC-MMAF-лекарственное средство» в дозах, представленных в таблице 16, приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с конъюгатами лекарственного средства, используемыми в качестве контроля.

Кроме того, в том же исследовании, для каждой группы, которой вводили дозы, определяли процент изменения массы тела за первые 14 дней. Результаты (фигура 38В) показали, что введение этих конъюгатов «тио-MAb-лекарственное средство» не приводило к снижению процента массы тела или к потере массы в течение данного периода времени.

В таблице 16 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³). (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 16 Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тию-huMA79b.v28-НС(A118C)-DM1 и MMAF мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами Granta-519					
Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAF или DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство /Ab)
Тео-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	342	12	1,86
Тео-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	346	12	1,9

Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/6	0/6	55	2	1,85
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	110	4	1,85
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/8	4/8	219	8	1,85
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	5/8	329	12	1,85
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	1/8	1/8	57	2	1,95
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	2/8	1/8	115	4	1,95
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	6/8	2/8	229	8	1,95
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	4/8	4/8	344	12	1,95

Г. Ксенотрансплантаты WSU-DLCL2 (диффузной крупноклеточной лимфомы)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали эффективность конъюгатов «тио-Mab-лекарственное средство» в ксенотрансплантатах WSU-DLCL2 (диффузной крупноклеточной лимфомы) у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и контроля) представлены ниже в таблице 17.

Контрольное антитело представляло собой носитель (только буфер (для ADC)). Контрольное тео-MAb представляло собой антитело тео-Mab тео-hu-анти-HER2-HC (A118C) (конъюгированное с BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE или MC-MMAF). Результаты представлены в таблице 17 и на фигуре 39.

На фигуре 39 представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантатов WSU-DLCL2 у мышей CB17 SCID, обработанных конъюгатами TDC «тяжелая цепь с A118C анти-CD79b антитела» в дозах, указанных в таблице 17. В частности, введение конъюгата тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF и тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (при дозе Ab 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг и 4,0 мг/кг) приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с ростом опухоли после обработки негативным контролем (тео-hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, тео-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, тео-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF и А-носитель).

Более того, в таблице 17 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 17

Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тео-HuMA79b.v28-HC(A118C)MMAE, MMAF и DM1 мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами WSU-DLCL2

Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAE или DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/Ab)
контроль носитель	0/9	0/9	NA	NA	NA
Тео-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1,86
Тео-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1,55
Тео-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	2/9	112	4	1,9
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/9	0/9	110	4	1,85
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	0/9	14	0,5	1,9
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	27	1,0	1,9

Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	1/9	55	2,0	1,9
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	7/9	110	4,0	1,9

Н. Ксенотрансплантаты Granta-519 (лимфомы клеток коры головного мозга человека)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали эффективность конъюгатов «тео-Mab-лекарственное средство» в ксенотрансплантатах Granta-519 (лимфомы клеток коры головного мозга человека) у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 18.

Контрольное тео-MAb представляло собой тео-hu-анти-HER2-HC(A118C) (конъюгированное с BMPEO-DM1) и антитело тео-MAb тео-hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE. Результаты представлены ниже в таблице 18.

На фигуре 40А представлен график зависимости изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантата Granta-519 у мышей CB17 SCID, которым вводили конъюгат TDC «тяжелая цепь с A118C анти-CD79b антитела» в дозах, представленных в таблице 18. В частности, введение тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 и тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (в дозе Ab 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг и 4,0 мг/кг) приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с негативным контролем (тео-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1 и тео-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE).

Более того, в таблице 18 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 18
Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тео-HuMA79b.v28-HC(A118C)DM1 и MMAE мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами Granta-519

Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAF, MMAE или DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/Ab)
Тео-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Тео-контроль hu-анти-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/10	1/10	92	4	1,55
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	0/10	110	4	1,85
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	1/10	13	0,5	1,87
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	0/10	27	1,0	1,87
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	7/10	54	2,0	1,87
Тео-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	10/10	108	4,0	1,87

И. Ксенотрансплантаты BJAB, содержащие CD79b собакоподобных обезьян (BJAB-cynoCD79b)

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали

эффективность конъюгатов «тио-Маб-лекарственное средство» в ксенотрансплантатах клеток ВJAB (лимфомы Беркитта), экспрессирующих CD79b собакоподобных обезьян (ВJAB-cynoCD79b), у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 18.

Контрольное Аб представляло собой носитель (только буфер). Контрольные тио-Маб представляли собой антитела тио-Маб, а именно тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-MC-MMAF и тио-hu-анти-HER2-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE. Результаты представлены ниже в таблице 19 и на фигуре 50.

На фигуре 50 представлен график зависимости ингибирования роста опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантатов (ВJAB-cynoCD79b) у мышей CB17 SCID, обработанных TDC «тяжелая цепь с A118C анти-CD79b антитела» в дозах, указанных в таблице 19. В частности, введение тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE и тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-MC-MMAF, а также тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE и тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MC-MMAF приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с ростом опухоли после обработки негативным контролем (тио-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1, тио-анти-HER2-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE, тио-анти-HER2-НС(A118C)-MC-MMAF и А-носитель).

Более того, в таблице 19 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 19 Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тио-анти-cyno CD79b(ch10D10)-НС(A118C) DM1, MMAF или MMAE или тио-HuMA79b.v28 DM1, MMAF или MMAE мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами ВJAB-cynoCD79b					
Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAF, MMAE или DM1 (мкг/м ²)	Доза Аб (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/ Аб)
контроль носитель	0/9	0/9	NA	NA	NA
Тио-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	57	2	1,86
Тио-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	23	1	1,55
Тио-контроль hu-анти-HER2-НС(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	29	1	1,9
Тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	1/8	53	2	1,8
Тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	2/9	27	1	1,86
Тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-MC-MMAF	0/9	1/9	28	1	1,9
Тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-BMPEO-DM1	3/9	0/9	55	2	1,85
Тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	2/9	27	1	1,9
Тио-huMA79b.v28-НС(A118C)-MC-MMAF	7/9	1/9	28	1	1,9

45 J. Ксенотрансплантаты ВJAB-cynoCD79b

В аналогичном исследовании, проводимом в соответствии с тем же самым протоколом анализа ксенотрансплантата, описанным в примере 3 (см. выше), но с различными

конъюгатами лекарственных средств и с различными их дозами, оценивали эффективность конъюгатов «тио-MAb-лекарственное средство» в ксенотрансплантатах клеток BJAB (лимфомы Беркитта), экспрессирующих CD79b собакоподобных обезьян (BJAB-супоCD79b), у мышей CB17 SCID. Конъюгаты лекарственного средства и дозы (вводимые на день 0 для всех ADC и для контроля) представлены ниже в таблице 19.

Контрольные тио-MAb представляли собой антитела тио-MAb, а именно тио-hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1, тио-huMA79b.v28-NC(A118C) и тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-NC(A118C). Результаты представлены ниже в таблице 20 и на фигуре 51.

На фигуре 51 представлен график зависимости ингибирования роста опухоли в зависимости от времени для ксенотрансплантатов BJAB-супоCD79b у мышей CB17 SCID, обработанных TDC «тяжелая цепь с A118C анти-CD79b антитела» в дозах, указанных в таблице 20. В частности, введение тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1, а также тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-NC(A118C)-BMPEO-DM1 приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с ростом опухоли после обработки негативным контролем (тио-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1). Другой контроль представлял собой тио-hu-MA79b.v28-NC(A118C) и тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-NC(A118C).

Результаты представлены ниже в таблице 20. В таблице 20 указано число мышей из общего числа протестированных мышей, обнаруживающих PR (PR = частичная регрессия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался менее чем на 50% от объема опухоли, измеренного на день 0) или CR (CR = полная ремиссия) (где объем опухоли через любой период времени после введения снижался до 0 мм³), NA = не определяли. (DAR = отношение лекарственного средства к антителу).

Таблица 20 Снижение объема опухоли in vivo путем введения конъюгата тио-анти-супо CD79b(ch10D10)-NC(A118C) DM1 или тио-HuMA79b.v28-NC(A118C)DM1 мышам CB17 SCID с ксенотрансплантатами BJAB-супоCD79b						
Вводимое антитело	PR	CR	Доза MMAF, MMAE или DM1 (мкг/м ²)	Доза Ab (мг/кг)	DAR (Лекарственное средство/Ab)	
Тио-контроль hu-анти-HER2-NC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1,86	
Тио-контроль huMA79b.v28-NC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA	
Тио-контроль анти-супоCD79b(ch10D10)-NC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA	
Тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1	1/10	0/10	27	1	1,85	
Тио-huMA79b.v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	2/10	55	2	1,85	
Тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-NC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	27	1	1,8	
Тио-анти-супоCD79b(ch10D10)-NC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	53	2	1,8	

Представленное выше описание является вполне достаточным для практического осуществления настоящего изобретения специалистом в данной области. Объем настоящего изобретения не ограничивается заявленной конструкцией, поскольку заявленный вариант был представлен лишь в целях иллюстрации некоторых аспектов изобретения, и в объем настоящего изобретения могут быть включены любые конструкции, которые являются функциональным эквивалентом заявленных конструкций. Заявленный материал не должен быть истолкован как указание на то, что этот материал является неадекватным для практического осуществления любого аспекта изобретения, включая наилучший вариант его осуществления, и такие конкретно проиллюстрированные варианты не должны рассматриваться как ограничение объема притязаний. Действительно, исходя из представленного выше описания, специалистом

в данной области могут быть сделаны различные модификации, которые, помимо проиллюстрированных и описанных в настоящей заявке, также будут входить в объем прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Гуманизированное сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами, содержащее

(а) легкую цепь и тяжелую цепь и

(б) по меньшей мере один свободный цистеиновый аминокислотный остаток в положении, выбранном из: V205C по Кэбату и A118C в соответствии с Европейской системой нумерации, где A118C в соответствии с Европейской системой нумерации расположена в тяжелой цепи и где V205C по Кэбату расположена в легкой цепи, и дополнительно, где указанное анти-CD79b антитело содержит CDR, выбранные из:

(i) HVR-L1 с последовательностью KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO:194);

(ii) HVR-L2 с последовательностью AASNLES (SEQ ID NO:195);

(iii) HVR-L3 с последовательностью QQSNEEDPLT (SEQ ID NO:196);

(iv) HVR-H1 с последовательностью GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:202);

(v) HVR-H2 с последовательностью GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO:203); и

(vi) HVR-H3 с последовательностью TRRVPIRLDY (SEQ ID NO:204);

(i) HVR-L1 с последовательностью KASQSVDDYDGDSFLN (SEQ ID NO:156);

(ii) HVR-L2 с последовательностью AASNLES (SEQ ID NO:157);

(iii) HVR-L3 с последовательностью QQSNEEDPLT (SEQ ID NO:158);

(iv) HVR-H1 с последовательностью GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:164);

(v) HVR-H2 с последовательностью GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO:165); и

(vi) HVR-H3 с последовательностью TRRVPVYFDY (SEQ ID NO:166);

(i) HVR-L1 с последовательностью KASQSVDDYDGDSFLN (SEQ ID NO:175);

(ii) HVR-L2 с последовательностью AASNLES (SEQ ID NO:176);

(iii) HVR-L3 с последовательностью QQSNEEDPLT (SEQ ID NO:177);

(iv) HVR-H1 с последовательностью GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:183);

(iv) HVR-H2 с последовательностью GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO:184); и

(vi) HVR-H3 с последовательностью TRRVPIRLDY (SEQ ID NO:185); и

(i) HVR-L1 с последовательностью KASQSVDDYSGDSFLN (SEQ ID NO:213);

(ii) HVR-L2 с последовательностью AASNLES (SEQ ID NO:176);

(iii) HVR-L3 с последовательностью QQSNEEDPLT (SEQ ID NO:177);

(iv) HVR-H1 с последовательностью GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:221);

(iv) HVR-H2 с последовательностью GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO:222); и

(vi) HVR-H3 с последовательностью TRRVPIRLDY (SEQ ID NO:223).

2. Гуманизированное сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.1, содержащее:

(i) HVR-L1 с последовательностью KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO:194);

(ii) HVR-L2 с последовательностью AASNLES (SEQ ID NO:195);

(iii) HVR-L3 с последовательностью QQSNEEDPLT (SEQ ID NO:196);

(iv) HVR-H1 с последовательностью GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:202);

(v) HVR-H2 с последовательностью GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO:203); и

(vi) HVR-H3 с последовательностью TRRVPIRLDY (SEQ ID NO:204).

3. Гуманизированное сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.2, в котором вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO:207, а вариабельный домен тяжелой цепи содержит

последовательность SEQ ID NO:208.

4. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.1, содержащее последовательность SEQ ID NO:255.

5. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.1, содержащее последовательность SEQ ID NO:284.

6. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.1, в котором легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO:233, а тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO:232.

7. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где по меньшей мере один свободный аминокислотный остаток цистеина расположен в тяжелой цепи.

8. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.7, где тяжелая цепь антитела дополнительно содержит дополнительный аминокислотный остаток цистеина в положении, выбранном из: V5C, A23C, A84C, S112C по Кэбату и T120C, V282C, S375C, S400C в соответствии с Европейской системой нумерации, где каждое положение расположено в тяжелой цепи.

9. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где по меньшей мере один свободный аминокислотный остаток цистеина расположен в легкой цепи.

10. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.9, где легкая цепь антитела содержит дополнительную свободную аминокислоту в положении, выбранном из: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C по Кэбату, где каждое положение расположено в легкой цепи.

11. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где антитело получено способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков в нативной последовательности родительского анти-CD79b антитела на цистеин, и где родительское антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из: SEQ ID NO:308, 304, 306 и 310, и/или последовательность легкой цепи, выбранную из: SEQ ID NO:307, 303, 305 и 309.

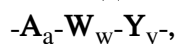
12. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство (D)», направленное против CD79b, где антитело представляет собой гуманизированное сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по любому из пп.1-11, а лекарственное средство представляет собой молекулу лекарственного средства, где антитело и лекарственное средство ковалентно связаны посредством по меньшей мере одного свободного цистеинового аминокислотного остатка с образованием соединения-конъюгата.

13. Соединение-конъюгат по п.12, где гуманизированное сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами присоединено к молекуле лекарственного средства (D) с помощью линкерной молекулы (L) посредством по меньшей мере одного свободного аминокислотного остатка цистеина, где соединение имеет формулу I



где p равно 1, 3, 4 или предпочтительно 2.

14. Соединение-конъюгат по п.13, где L представляет собой



где A представляет собой удлиняющий компонент, ковалентно связанный с тиолом цистеина сконструированного антитела с цистеиновыми заменами (Ab);

a равно 0 или 1;

каждый W независимо представляет собой аминокислотную единицу;

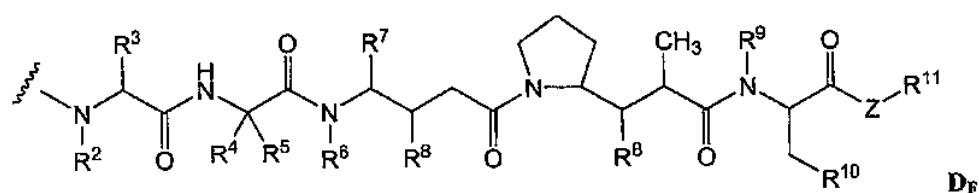
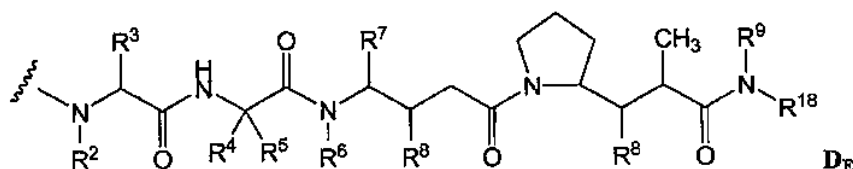
в равно целому числу от 0 до 12;

Y представляет собой спейсерный компонент, ковалентно связанный с молекулой лекарственного средства и

у равно 0, 1 или 2.

15. Соединение-конъюгат по п.13, где D выбрано из группы, состоящей из майтанзиноида, ауристатина и доластатина.

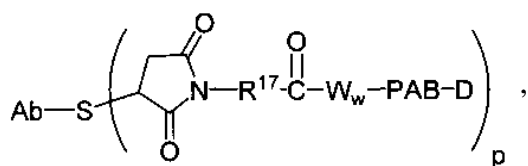
16. Соединение-конъюгат по п.15, где D представляет собой ауристатин или доластатин и где D представляет собой молекулу лекарственного средства формулы D_E или D_F:



где каждый R² и R⁶ представляет собой метил; каждый R³ и R⁴ представляет собой изопропил; R⁵ представляет собой H; R⁷ представляет собой втор-бутил; каждый R⁸ независимо выбран из -OCH₃, OH и H; R⁹ представляет собой H; R¹⁰ представляет собой арил; Z представляет собой -O- или -NH; R¹¹ представляет собой H, C₁-C₈алкил или -(R¹³O)_m-R¹⁴, где R¹³ представляет собой C₂-алкил, R¹⁴ представляет собой C₁-алкил и m равно 1; R¹⁸ представляет собой -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-арил.

17. Соединение-конъюгат по п.13, где конъюгат «антитело-лекарственное средство» имеет формулу

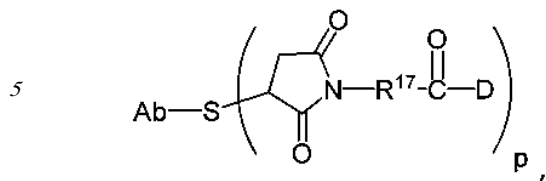
(a)



где PAB представляет собой пара-аминобензилкарбамоил, а R¹⁷ представляет собой двухвалентный радикал, выбранный из (CH₂)_r, C₃-C₈карбоциклила, -O-(CH₂)_r, арилена, (CH₂)_r-арилена, -арилена-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(C₃-C₈-карбоциклила), (C₃-C₈-карбоциклил)-(CH₂)_r-, C₃-C₈-гетероциклила, (CH₂)_r-(C₃-C₈-гетероциклила), -(C₃-C₈-гетероциклил)-(CH₂)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂)C(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂)C(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂- и -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, где R^b представляет собой H, C₁-C₆алкил, фенил или бензил, а r независимо равен целому числу от 1 до 10.

18. Соединение-конъюгат по п.14, где W_w представляет собой валин-цитруллин.

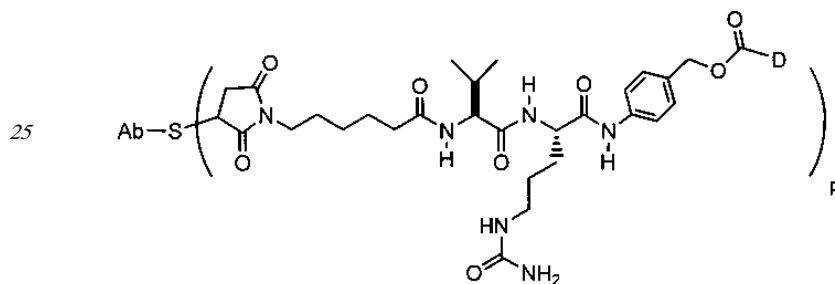
19. Соединение-конъюгат по п.14, имеющее формулу



где R^{17} представляет собой двухвалентный радикал, выбранный из $(CH_2)_r$, C_3 - C_8 карбоциклила, $-O-(CH_2)_r$, арилена, $(CH_2)_r$ -арилена, арилен- $(CH_2)_r$, $(CH_2)_r$ -(C_3 - C_8 карбоциклила), $-(C_3$ - C_8 карбоциклил)- $(CH_2)_r$, C_3 - C_8 -гетероциклила, $(CH_2)_r$ -(C_3 - C_8 гетероциклила), $(C_3$ - C_8 -гетероциклил)- $(CH_2)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$, $-(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $(CH_2)C(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$, $(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ и $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$, где R^b представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, фенил или бензил и r независимо представляет собой целое число 1-10.

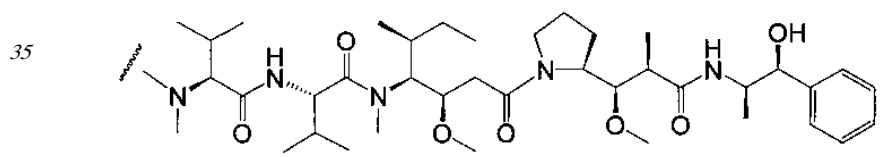
20. Соединение-конъюгат по п.19, где R^{17} представляет собой $(CH_2)_5$ или $(CH_2)_2$.

21. Соединение-конъюгат по п.13, имеющее формулу

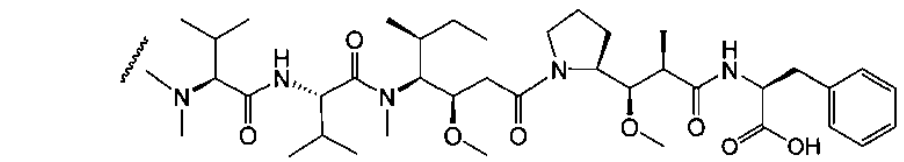


22. Соединение-конъюгат по п.13, где L представляет собой SMCC, SPP, SPDB или BMPEO.

23. Соединение-конъюгат по п.13, где D представляет собой либо MMAE, предпочтительно имеющее структуру

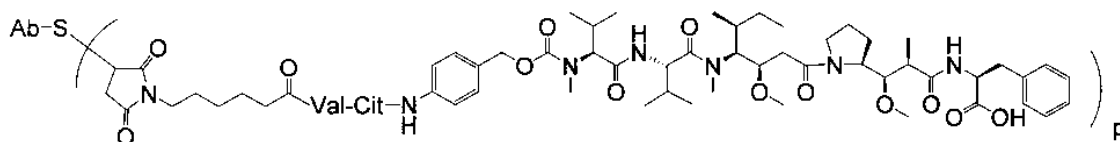


где волнистая линия обозначает сайт связывания с линкером L; либо MMAF, предпочтительно имеющее структуру



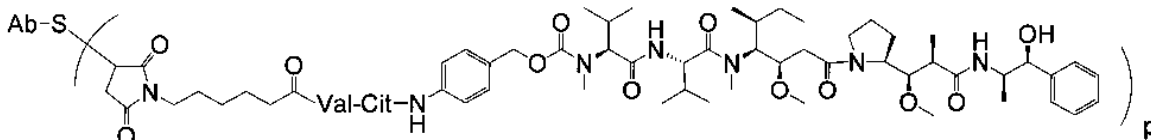
где волнистая линия обозначает сайт связывания с линкером L.

24. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство», направленное против CD79b, выбранное из структур:



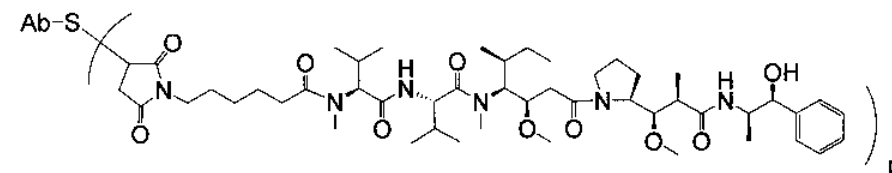
Ab-MC-vc-PAB-MMAF,

где Val представляет собой валин; Cit представляет собой цитруллин; p равно 1, 2, 3 или 4;



Ab-MC-vc-PAB-MMAE,

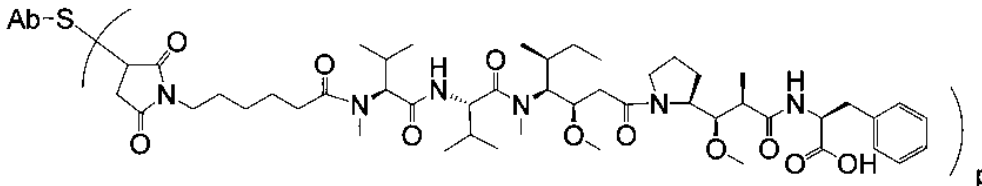
где Val представляет собой валин; Cit представляет собой цитруллин; p равно 1, 2, 3 или 4;



Ab-MC-MMAE,

где p равно 1, 2, 3 или 4;

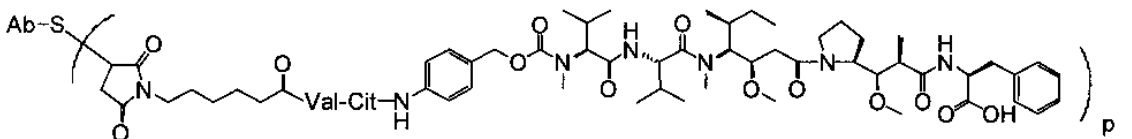
ИЛИ



Ab-MC-MMAF,

где р равно 1, 2, 3 или 4, где антитело является гуманизированным анти-CD79b антителом по любому из пп.1-11, где антитело конъюгировано посредством по меньшей мере одного свободного цистеинового аминокислотного остатка.

25. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.24, имеющее структуру



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

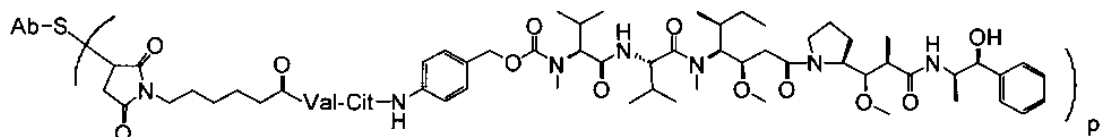
где Val представляет собой валин; Cit представляет собой цитруллин; p равно 1, 2, 3 или 4, где антитело является антителом по любому из пп.1-11, где антитело конъюгировано посредством по меньшей мере одного свободного цистеинового аминокислотного остатка.

26. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.25, где антитело

представляет собой антитело по п.4.

27. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.25, где антитело представляет собой антитело по п.5.

28. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.24, имеющее структуру



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

где Val представляет собой валин; Cit представляет собой цитруллин; p равно 1, 2, 3 или 4, где антитело является антителом по любому из пп.1-11, где антитело конъюгировано посредством по меньшей мере одного свободного цистеинового аминокислотного остатка.

29. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.28, где антитело является антителом по п.2.

30. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.28, где антитело является антителом по п.3.

31. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.28, где антитело является антителом по п.4.

32. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.28, где антитело является антителом по п.5.

33. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по п.28, где антитело является антителом по п.6.

34. Сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами по любому из пп.1-11, где родительское анти-CD79b антитело выбрано из моноклонального антитела, биспецифического антитела, химерного антитела, антитела человека, гуманизированного антитела и фрагмента антитела, предпочтительно фрагмента Fab.

35. Соединение-конъюгат «антитело-лекарственное средство» по любому из пп.13-23, 26, 27 или 29-33, где родительское анти-CD79b антитело выбрано из моноклонального антитела, биспецифического антитела, химерного антитела, антитела человека, гуманизированного антитела и фрагмента антитела, предпочтительно фрагмента Fab.

36. Конъюгат «антитело-лекарственное средство» по любому из пп.24-32, где антитело получено способом, предусматривающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского анти-CD79b антитела цистеином, где родительское антитело содержит:

- a) SEQ ID NO:307 и/или SEQ ID NO:308;
- b) SEQ ID NO:303 и/или SEQ ID NO:304;
- c) SEQ ID NO:305 и/или SEQ ID NO:306 или
- d) SEQ ID NO:309 и/или SEQ ID NO:310.

37. Фармацевтический состав для лечения рака, содержащего клетки, экспрессирующие или сверхэкспрессирующие CD79b, содержащий эффективное количество сконструированного анти-CD79b антитела с цистеиновыми заменами по любому из пп.1-11 или конъюгат «антитело-лекарственное средство» по любому из пп.12-32 и фармацевтически приемлемый растворитель, носитель или эксципиент.

38. Фармацевтический состав по п.37, дополнительно содержащий терапевтически эффективное количество другого лекарственного средства.

39. Фармацевтический состав по п.38, где лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из бортезомиба, тамоксифена, летрозолола, эксеместана, анастрозолола, иринотекана, цетуксимаба, фульвестранта, винорелбина, эрлотиниба, бевацизумаба, винкристина, иматиниба, сорафиниба, лапатиниба, трастузумаба, цисплатина, гемцитабина, метотрексатата, винбластина, карбоплатина, паклитаксела, 5-фторурацила, доксорубицина, мелфалана, преднизолона и доцетаксела.

40. Фармацевтический состав по п.38, где лекарственное средство представляет собой анти-CD20 антитело.

41. Фармацевтический состав по п.38 или 40, дополнительно содержащий один или более из циклофосфамида, гидроксидаунорубицина, адриамицина и доксорубицина.

42. Способ детекции белка CD79b в образце, предположительно содержащем указанный белок, где указанный способ предусматривает приведение в контакт указанного образца с сконструированным анти-CD79b антителом с цистеиновыми заменами по п.1 и определение связывания указанного антитела с указанным белком CD79b в указанном образце, где указанное антитело ковалентно связано с меткой и где связывание антитела с указанным белком является показателем присутствия указанного белка в указанном образце.

43. Способ по п.42, где детекция является количественной.

44. Способ по п.42, где детекция является качественной.

45. Способ по п.42, где указанное антитело ковалентно связано с меткой, выбранной из флуоресцентного красителя, радиоизотопа, биотина или лиганда, образующего комплекс с металлом; или где указанный образец содержит клетку, предположительно экспрессирующую указанный белок CD79b, или где указанная клетка является злокачественной клеткой гематопоетической опухоли.

46. Способ детекции раковых клеток, экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CD79b, осуществляемый в биологическом образце, предусматривающий:

(а) обработку клеток соединением-конъюгатом «антитело-лекарственное средство» по п.12 и

(б) детекцию связывания соединения-конъюгата «антитело-лекарственное средство» с клетками,

где раковые клетки являются клетками гематопоетической опухоли.

47. Способ по п.46, где детекция является количественной.

48. Способ по п.46, где детекция является качественной.

49. Способ ингибирования клеточной пролиферации, предусматривающий обработку опухолевых клеток млекопитающего в среде для культивирования клеток соединением-конъюгатом «антитело-лекарственное средство» по п.12, тем самым ингибируя пролиферацию опухолевых клеток, где опухолевые клетки млекопитающих предпочтительно представляют собой клетки гематопоетической опухоли, экспрессирующие или сверхэкспрессирующие CD79b.

50. Антитело по любому из пп.1-11 для применения в способе лечения гематопоетического рака.

51. Антитело по п.50, где гематопоетический рак выбран из группы, состоящей из лимфомы, миеломы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, агрессивной НХЛ, бессимптомной НХЛ, фолликулярной лимфомы, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ)

и лимфомы клеток коры головного мозга.

52. Антитело по п.50, где способ предусматривает введение эффективного количества другого лекарственного средства пациенту в сочетании с антителом.

53. Антитело по п.52, где лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из бортезомиба, тамоксифена, летрозолола, эксеместана, анастрозолола, иринотекана, цетуксимаба, фульвестранта, винорелбина, эрлотиниба, бевацизумаба, винкристина, иматиниба, сорафиниба, лапатиниба, трастузумаба, цисплатина, гемцитабина, метотрексатата, винбластина, карбоплатина, паклитаксела, 5-фторурацила, доксорубицина, мелфалана, преднизолона и доцетаксела.

54. Антитело по п.52, где лекарственное средство представляет собой анти-CD20 антитело.

55. Антитело по п.52 или 54, дополнительно содержащее один или более из циклофосфида, гидроксидаунорубицина, адриамицина и доксорубицина.

56. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство (D)» по любому из пп.12-33, 35 и 36 для применения в способе лечения гематопозитического рака.

57. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство (D)» по п.56, где гемопозитический рак выбран из группы, состоящей из лимфомы, миеломы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, агрессивной НХЛ, бессимптомной НХЛ, фолликулярной лимфомы, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

58. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство (D)» по п.56, где способ предусматривает введение эффективного количества другого лекарственного средства пациенту в сочетании с соединением-конъюгатом «антитело-лекарственное средство».

59. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство (D)» по п.58, где лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из бортезомиба, тамоксифена, летрозолола, эксеместана, анастрозолола, иринотекана, цетуксимаба, фульвестранта, винорелбина, эрлотиниба, бевацизумаба, винкристина, иматиниба, сорафиниба, лапатиниба, трастузумаба, цисплатина, гемцитабина, метотрексатата, винбластина, карбоплатина, паклитаксела, 5-фторурацила, доксорубицина, мелфалана, преднизолона и доцетаксела.

60. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство (D)» по п.58, где лекарственное средство представляет собой анти-CD20 антитело.

61. Соединение-конъюгат «антитело (Ab)-лекарственное средство (D)» по п.58 или 60, дополнительно содержащее один или более из циклофосфида, гидроксидаунорубицина, адриамицина и доксорубицина.

62. Фармацевтический состав по п.37 для применения в способе лечения гематопозитического рака.

63. Фармацевтический состав по п.62, где гемопозитический рак выбран из группы, состоящей из лимфомы, миеломы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, агрессивной НХЛ, бессимптомной НХЛ, фолликулярной лимфомы, рецидивирующей агрессивной НХЛ, рецидивирующей бессимптомной НХЛ, не поддающейся лечению НХЛ, не поддающейся лечению бессимптомной НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной

лимфоцитарной лимфомы, лейкоза, ретикулоэндотелиоза (РЭ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы клеток коры головного мозга.

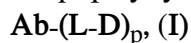
64. Фармацевтический состав по п.62, где способ предусматривает введение эффективного количества другого лекарственного средства пациенту в сочетании с фармацевтическим составом.

65. Фармацевтический состав по п.64, где лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из бортезомиба, тамоксифена, летрозолола, эксеместана, анастрозолола, иринотекана, цетуксимаба, фульвестранта, винорелбина, эрлотиниба, бевацизумаба, винкристина, иматиниба, сорафиниба, лапатиниба, трастузумаба, цисплатина, гемцитабина, метотрексатата, винбластина, карбоплатина, паклитаксела, 5-фторурацила, доксорубицина, мелфалана, преднизолона и доцетаксела.

66. Фармацевтический состав по п.64, где лекарственное средство представляет собой анти-CD20 антитело.

67. Фармацевтический состав по п.64 или 66, дополнительно содержащее один или более из циклофосфамида, гидроксидаунорубицина, адриамицина и доксорубицина.

68. Способ получения соединения-конъюгата «антитело-лекарственное средство», содержащего гуманизированное сконструированное анти-CD79b антитело с цистеиновыми заменами (Ab) по п.1 и молекулу ауристатинного лекарственного средства (D), где указанное сконструированное антитело с цистеиновыми заменами присоединено к D линкерной молекулой (L) посредством по меньшей мере одного сконструированного цистеинового аминокислотного остатка, где указанное соединение имеет формулу I



где p равно 1, 2, 3 или 4; способ предусматривает стадии:

(a) взаимодействия сконструированной цистеиновой группы сконструированного антитела с цистеиновыми заменами с линкерным реагентом с получением промежуточного соединения «антитело-линкер» Ab-L и

(b) взаимодействия Ab-L с активированной группой лекарственного препарата D, с образованием, таким образом, конъюгата «антитело-лекарственное средство»,

или предусматривает стадии:

(c) взаимодействия нуклеофильной группы молекулы лекарственного средства с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения «лекарственное средство-линкер» D-L и

(d) взаимодействия D-L с сконструированным антителом с цистеиновыми заменами, с образованием, таким образом, конъюгата «антитело-лекарственное средство», где способ, необязательно, предусматривает стадию экспрессирования сконструированного антитела с цистеиновыми заменами в клетках яичника китайского хомячка (СНО).

69. Способ по п.68, дополнительно предусматривающий стадию обработки экспрессированного сконструированного антитела с цистеиновыми заменами восстановителем, где восстановитель предпочтительно выбран из ТСЕР и DTT.

70. Способ по п.69, дополнительно предусматривающий стадию обработки экспрессированного сконструированного антитела с цистеиновыми заменами окислителем, где указанный окислитель предпочтительно выбран из сульфата меди, дегидроаскорбиновой кислоты и воздуха.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Genentech, Inc.
 Chen, Yvonne
 Dennis, Mark
 Dornan, David
 Elkins, Kristi
 Junutula, Jagath Reddy
 Polson, Andrew
 Zheng, Bing

<120> АНТИ-CD79В АНТИТЕЛА И ИММУНОКОНЬЮГАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<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> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50
 tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100
 aggctggcgt tgtctcctgt gccagccac tggatggtgg cgttgctgct 150
 gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccggtacc 200
 ggaatcccaa aggtagtgtc tgttcgcgga tctggcagag cccacgtttc 250
 atagccagga aacggggctt cacggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300
 cgccctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350
 cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaagagtc ccagaacgaa 400
 tctctcgcca cctcaccat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450
 ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcgagggtc taccagggct 500
 ggcgcacaga gctgcgagtc atgggattca gcaccttggc acagctgaag 550
 cagaggaaca cgctgaagga tggatcatc atgatccaga cgctgctgat 600
 catcctcttc atcatcgtgc ctatcttcct gctgctggac aaggatgaca 650
 gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgaggcct ggacattgac 700
 cagacagcca cctatgagga catagtgcg ctgcgagagc ggaagtga 750
 gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800

tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850
gctcatggcc caaccccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900
gcccaccaga gctgccatth gtctccagcc cctgggtcccc agctcttgcc 950
aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttgg agggagttct 1000
ctgggggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050
ccccacacat gggatggggg aggcagagac tgggtccagag cccgcaaagt 1100
gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150
aactgggccc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200
tcccacccca gggaggccct ggctccagt gccttcccc gtggaataaa 1250
cggtgtgtcc tgagaaacca 1270

<210> 2

<211> 229

<212> БЕЖОК

<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> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Легкая цепь химерного антитела (chMA79b)

<400> 3
 cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg 50
 ggatggatcat gtatcatcct ttttctagta gcaactgcaa ctggagtaca 100
 ttcagatata gtgctgaccc aatctccagc ttctttggct gtgtctctgg 150
 ggcagagggc caccatctcc tgcaaggcca gccaaagtgt tgattatgat 200
 ggtgatagtt ttttgaactg gtaccaacag aaaccaggac agccacccaa 250
 actcttcata tatgctgcat ccaatctaga atctgggata ccagccaggt 300
 ttagtggcag tgggtctggg acagacttca ccctcaacat ccatactgtg 350
 gaggaggagg atgctgcaac ctattactgt cagcaaagta atgaggatcc 400
 gctcacgttc ggggcaggca ccgagctgga actcaaacgg accgtggctg 450
 caccatctgt cttcatcttc ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga 500
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa 550
 agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 600
 gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 650
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga 700
 agtcacccat cagggcctga gctcgcccg cacaaagagc ttcaacaggg 750
 gagagtgtta agcttggccg ccatggccca acttggtttat tgcagcttat 800
 aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 850
 tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt 900
 atcatgtctg gatcggaat taattcggc 929

<210> 4
 <211> 218
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Легкая цепь химерного антитела (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> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь химерного антитела (chMA79b)

<400> 5

```

tcggttctat cgattgaatt ccaccatggg atgggtcatgt atcatccttt 50
ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt cagaagttca gctgcagcag 100
tctggggctg aactgatgaa gcctggggcc tcagtgaaga tatcctgcaa 150
ggctactggc tacacattca gtagttactg gatagagtgg gtaaagcaga 200

```

ggccctggaca tggccttgag tggattggag agattttacc tggaggtggt 250
 gataactaact acaatgagat tttcaagggc aaggccacat tcaactgcaga 300
 tacatcctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg 350
 actctgccgt ctattactgt acaagacgag taccggttta ctttgactac 400
 tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc 450
 atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag 500
 cggccctggg ctgcttggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 550
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt 600
 cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg actgtgccct 650
 ctagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 700
 agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 750
 tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag 800
 tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 850
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt 900
 caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa 950
 agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 1000
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt 1050
 ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 1100
 aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggaa 1150
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 1200
 tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1250
 actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь химерного антитела (chMA79b)

<400> 6

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

RU 2 553 566 C2

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> 7
 <211> 231
 <212> BEJOK
 <213> Macaca fascicularis

<400> 7	
Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Ser Ser His Trp Leu Val	
1 5 10	15
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala	
20 25	30
Lys Ser Glu Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser	
35 40	45
Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe	
50 55	60
Thr Val Lys Met His Cys Tyr Val Thr Asn Ser Thr Phe Ser Ile	
65 70	75
Val Ser Trp Leu Arg Lys Arg Glu Thr Asp Lys Glu Pro Gln Gln	
80 85	90
Val Asn Leu Glu Gln Gly His Met His Gln Thr Gln Asn Ser Ser	
95 100	105
Val Thr Thr Leu Ile Ile Gln Asp Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly	
110 115	120
Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Glu Cys Ser Lys Thr Ser Glu Val Tyr	
125 130	135
Arg Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu	
140 145	150
Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met	
155 160	165
Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe	
170 175	180

RU 2 553 566 C2

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> BEJOK
<213> Mus musculus

<400> 8
Met Ala Thr Leu Val Leu Ser Ser Met Pro Cys His Trp Leu Leu
1 5 10 15

Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ser Gly Glu Pro Val Pro Ala Met Thr
20 25 30

Ser Ser Asp Leu Pro Leu Asn Phe Gln Gly Ser Pro Cys Ser Gln
35 40 45

Ile Trp Gln His Pro Arg Phe Ala Ala Lys Lys Arg Ser Ser Met
50 55 60

Val Lys Phe His Cys Tyr Thr Asn His Ser Gly Ala Leu Thr Trp
65 70 75

Phe Arg Lys Arg Gly Ser Gln Gln Pro Gln Glu Leu Val Ser Glu
80 85 90

Glu Gly Arg Ile Val Gln Thr Gln Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu
95 100 105

Thr Ile Gln Asn Ile Gln Tyr Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys
110 115 120

Lys Gln Lys Cys Asp Ser Ala Asn His Asn Val Thr Asp Ser Cys
125 130 135

Gly Thr Glu Leu Leu Val Leu Gly Phe Ser Thr Leu Asp Gln Leu
140 145 150

Lys Arg Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu Ile Gln Thr
155 160 165

Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu
170 175 180

Asp Lys Asp Asp Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr
185 190 195

Glu Gly Leu Asn Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val
200 205 210

Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
215 220 225

Gly Gln Glu

<210> 9

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys Arg

<210> 10

<211> 111

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен легкой цепи химерного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариабельный домен легкой цепи присоединенного гуманизированного антитела (huMA79b-гибрида)
 <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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys
 5 10

 <210> 13
 <211> 113
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

 Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60

 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 14

<211> 117

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен тяжелой цепи химерного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен тяжелой цепи присоединенного гуманизированного антитела (huMA79b-гибрида)

<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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 18
 Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 19
 Ala Ala Ser Asn Leu Lys Ser
 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 20

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Leu Thr
5

<210> 21

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 21

Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Leu Thr
5

<210> 22

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 22

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Arg
5

<210> 23

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 23

Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser
5

<210> 24

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 24

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Asn
5

<210> 25

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 25
 Ala Ala Arg Lys Leu Lys Arg
 5

<210> 26
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 26
 Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Arg
 5

<210> 27
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 27
 Ala Ala Arg Lys Leu Lys Ser
 5

<210> 28
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 28
 Ala Ala Arg Lys Leu Ala Ser
 5

<210> 29
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 29
 Ala Ala Gly Ile Leu Ala Arg
 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 30
 Ala Ala Arg Lys Leu Arg Ser
 5

<210> 31
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 31
 Ala Ala Arg Lys Leu Gly Ser
 5

 <210> 32
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 32
 Ala Ala Arg His Leu Lys Arg
 5

 <210> 33
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 33
 Ala Ser Arg Tyr Leu Ser Arg
 5

 <210> 34
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 34
 Ala Gly Ser Lys Leu Leu Arg
 5

 <210> 35
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 35
 Ala Ala Ser Asn Arg Lys Ser
 5

 <210> 36
 <211> 7
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 36

Ala Ala Ser Lys Leu Gly Ser
5

<210> 37

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 37

Ala Ala Arg Tyr Leu Arg Arg
5

<210> 38

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 38

Ala Ala Arg Arg Leu Arg Thr
5

<210> 39

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 39

Ala Ala Arg Arg Leu Gly Arg
5

<210> 40

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 40

Ala Ala Arg Gln Arg Lys Arg
5

<210> 41

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 41
 Ala Ala Arg Lys Leu Leu Arg
 5

<210> 42
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 42
 Ala Ala Arg Lys Leu Lys Asn
 5

<210> 43
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 43
 Ala Ala Arg Lys Leu Gly Thr
 5

<210> 44
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 44
 Ala Ala Arg Lys Leu Gly Gly
 5

<210> 45
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 45
 Ala Ala Arg Lys Leu Ala Arg
 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 46
 Gln Gln Ser Asn Ala Asp Pro Leu Thr
 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 47
 Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Leu Thr
 5

 <210> 48
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 48
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
 5

 <210> 49
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 49
 Gln Gln Ser Asn Asp Asp Pro Leu Thr
 5

 <210> 50
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 50
 Gln Gln Ser Asn Leu Asp Pro Leu Thr
 5

 <210> 51
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 51
 Asn Asn Ser Asn Gly Asp Pro Leu Asn
 5

 <210> 52
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 52

Gln Pro Asp Asn Glu Ala Pro Arg Thr
5

<210> 53

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 53

Asp Gln Arg Asn Ala Asp Pro Leu Thr
5

<210> 54

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 54

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 55

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 55

Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Gln
5 10

<210> 56

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 56

Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 57

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 57
Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 58
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 58
Gly Tyr Thr Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 59
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 59
Gly Tyr Ser Phe Lys Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 60
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 60
Pro Tyr Ser Leu Cys Thr Tyr Phe Ile Asp
5 10

<210> 61
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 61
Gly Tyr Tyr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 62
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 62
Gly Tyr Pro Phe Gly Arg Tyr Trp Val Asn
5 10

<210> 63
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 63
Gly Tyr Thr Phe Lys Lys Tyr Trp Ile Glu
 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 64
Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gln
 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 65
Gly Tyr Pro Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu
 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 66
Gly Tyr Pro Val Gly Arg Tyr Trp Ile Ser
 5 10

<210> 67
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 67
Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 68

Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 69

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 69

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu Ser
5 10

<210> 70

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 70

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 71

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 71

Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 72

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная последовательность

<400> 72

Gly Tyr Thr Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 73

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 73
Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 74
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 74
Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 75
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 75
Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 76
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 76
Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Tyr Trp Leu Gln
5 10

<210> 77
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 77
Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 78
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 78
Gly Tyr Pro Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 79
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 79
 Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Ser
 5 10

 <210> 80
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 80
 Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn
 5 10

 <210> 81
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 81
 Gly Tyr Pro Phe Arg Gly Tyr Trp Ile Glu
 5 10

 <210> 82
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 82
 Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Glu
 5 10

 <210> 83
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 83
 Gly Tyr Pro Phe Asn Gly Tyr Trp Ile Asn
 5 10

 <210> 84
 <211> 10
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 84

Gly Tyr Asn Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ser
5 10

<210> 85

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 85

Gly Phe Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 86

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 86

Gly Phe Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 87

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 87

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp
5 10

<210> 88

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 88

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
5 10

<210> 89

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 89
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Lys Leu Asp
 5 10

<210> 90
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 90
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp
 5 10

<210> 91
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 91
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
 5 10

<210> 92
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 92
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Phe Cys Leu Asp
 5 10

<210> 93
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 93
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp
 5 10

<210> 94
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 94
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
 5 10

<210> 95
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 95
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Lys Leu Asp
 5 10

 <210> 96
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 96
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Phe Asp
 5 10

 <210> 97
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 97
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
 5 10

 <210> 98
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 98
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Ser
 5 10

 <210> 99
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариант гуманизированного антитела

 <400> 99
 Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Val Leu Asp
 5 10

 <210> 100
 <211> 10
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 100

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Leu Asp
5 10

<210> 101

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 101

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Phe Asp
5 10

<210> 102

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 102

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Phe Leu Asp
5 10

<210> 103

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 103

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp
5 10

<210> 104

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 104

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
5 10

<210> 105

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 105

Cys Thr Arg Arg Arg Pro Val Cys Leu Asp
5 10

<210> 106

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант гуманизированного антитела

<400> 106

Cys Thr Arg Arg Ile Pro Val Tyr Phe Asp
5 10

<210> 107

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<400> 107

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
5 10

<210> 108

<211> 87

<212> БЕЛОК

<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> БЕЛОК

<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

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 112

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

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

<210> 114
 <211> 80
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

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

80

<210> 115
 <211> 79
 <212> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
<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> БЕЛОК
<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> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 120

34

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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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

RU 2 553 566 C2

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> БЕЖОК
 <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> БЕЖОК
 <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> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens

<400> 128

RU 2 553 566 C2

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> БЕЖОК

<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	Cys	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
				65					70					75
Lys	Val	Glu	Ile	Lys										
				80										

<210> 130

<211> 80

<212> БЕЖОК

<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	Cys	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
				65					70					75
Lys	Val	Glu	Ile	Lys										

80

<210> 131
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-LC huMA79b-гибрида

 <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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR2-LC huMA79b-гибрида

 <400> 132
 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 5

 <210> 133
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR3-LC huMA79b-гибрида

 <400> 133
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
 5

 <210> 134
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-NC huMA79b-гибрида

 <400> 134
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 5 10

 <210> 135
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR2-NC huMA79b-гибрида

 <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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR3-НС huMA79b-гибрида

 <400> 136
 Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr
 5 10

 <210> 137
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR3-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b. V28)

 <400> 138
 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
 5 10

 <210> 139
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 142
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

<210> 143
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

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

<210> 144
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 146
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 147
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Композиция FR3-НС вариантов гуманизированного антитела

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> Xaa представляет собой А или R

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> Xaa представляет собой Т или N

<220>
 <221> Xaa
 <222> 13
 <223> Xaa представляет собой А или 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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
 <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> БЕЛОК
<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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> FR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

<223> FR2-LC варианта гуманизированного антитела (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>	БЕЛОК
<213>	Искусственная последовательность

<223> FR3-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FR4-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

<400> 155

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

<210> 156

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR2-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

<400> 157

Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
			5			

<210> 158

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR3-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

<400> 158

Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr
			5					

<210> 159

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CL1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR1-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR2-НС вариант гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
	5	10

<210> 162
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR4-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

 <400> 163
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

 <210> 164
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

 <400> 164
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 5 10

 <210> 165
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR2-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR-Н3 варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v17)

 <400> 166
 Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr
 5 10

 <210> 167
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CH1-НС варианта гуманизированного антитела (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

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Fc-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельный домен LC-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельный домен НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FR2-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FR3-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FR4-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v18)

<400> 174

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 175
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR2-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v18)

<400> 176
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 177
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR3-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v18)

<400> 177
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 178
<211> 106
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CL1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR2-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v18)

<400> 180
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 5 10

<210> 181
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR4-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v18)

<400> 182
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 183
 <211> 10

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v18)

 <400> 183
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 5 10

 <210> 184
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR2-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR3-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v18)

 <400> 185
 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
 5 10

 <210> 186
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CH1-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Fc-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен HC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR4-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v28)

 <400> 193
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

 <210> 194
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR2-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v28)

<400> 195

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 5

<210> 196

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR3-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v28)

<400> 196

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
 5

<210> 197

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CL1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR2-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v28)

<400> 199
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 5 10

<210> 200
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR4-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v28)

<400> 201
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 202
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR1-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v28)

<400> 202
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 5 10

<210> 203
 <211> 18

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR2-HLC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR3-NC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v28)

<400> 204
 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 205
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1-NC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Fc-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен LC (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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельный домен HC гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR4-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v32)

 <400> 212
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

 <210> 213
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR2-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v32)

 <400> 214

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 215

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR3-LC варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v32)

<400> 215

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 216

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CL1-LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FR1-HC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v32)

 <400> 218
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 5 10

 <210> 219
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR4-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v32)

 <400> 220
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

 <210> 221
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR1-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v32)

 <400> 221
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 5 10

 <210> 222
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HVR2-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR3-НС варианта гуманизированного антитела (huMA79b.v32)

<400> 223
 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 224
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1-НС варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Fc-НС варианта гуманизированного антитела (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 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен LC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен HC варианта гуманизированного антитела (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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-MAb-huMA79b.v17-HC(A118C)

<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

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-MAb-huMA79b.v17-HC(Al18C)

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-MAb-huMA79b.v18-HC(A118C)

<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	

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-MAb-huMA79b.v18-HC(A118C)

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-MAb-huMA79b.v28-HC(All8C)

<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	

RU 2 553 566 C2

				155					160					165				
Gly	Val	His	Thr	Phe 170	Pro	Ala	Val	Leu	Gln 175	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr 180				
Ser	Leu	Ser	Ser	Val 185	Val	Thr	Val	Pro	Ser 190	Ser	Ser	Ser	Leu	Thr 195				
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys 200	Asn	Val	Asn	His	Lys 205	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys 210				
Val	Asp	Lys	Lys	Val 215	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys 220	Asp	Lys	Thr	His	Thr 225				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 230	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 235	Gly	Gly	Pro	Ser	Val 240				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 245	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 250	Leu	Met	Ile	Ser	Arg 255				
Thr	Pro	Glu	Val	Thr 260	Cys	Val	Val	Val	Asp 265	Val	Ser	His	Glu	Asp 270				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe 275	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 280	Gly	Val	Glu	Val	His 285				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 290	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 295	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 300				
Arg	Val	Val	Ser	Val 305	Leu	Thr	Val	Leu	His 310	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 315				
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 320	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 325	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 330				
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 335	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 340	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 345				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 350	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 355	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 360				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu 365	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 370	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 375				
Asp	Ile	Ala	Val	Glu 380	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 385	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 390				
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 395	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 400	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 405				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 410	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 415	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 420				
Asn	Val	Phe	Ser	Cys 425	Ser	Val	Met	His	Glu 430	Ala	Leu	His	Asn	His 435				
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 440	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 445	Gly								

<210>	233
<211>	218
<212>	БЕЛЮК
<213>	Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-MAb-huMA79b.v28-HC(A118C)

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-MAb-chMA79b- LC(V205C)

<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

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тио-MAb-chMA79b- LC(V205C)

<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	

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC-вариант тио-MAb-chMA79b- HC(A118C)

<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

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-MAb-chMA79b- HC(A118C)

<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
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

RU 2 553 566 C2

	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> ДНК

<213> Macaca fascicularis

<400> 238

```

tcatggtgat ggtgatgatg accggtacgc gtagaatcga gaccgaggag 50
agggtaggg ataggcttac ctgcgaaccg cgggccctct agactcgagc 100
ggccgccact gtgctggata tctgcagaat tgcccttggg gacagagcag 150
tgaccatggc caggctggcg ttgtctcctg tgtccagcca ctggctgggtg 200
gcgttgctgc tgctgctctc agcagctgag ccagtgccag cagccaaatc 250
agaggacctg tacccgaatc ccaaaggtag tgcttggtct cggatctggc 300
agagcccacg tttcatagcc aggaaacggg gcttcacggt gaaaatgcac 350
tgctacgtga ccaacagcac cttcagcatc gtgagctggc tccggaagcg 400
ggagacggac aaggagcccc aacaggtgaa cctggagcag ggccacatgc 450
atcagacca aaacagctct gtcaccaccc tcatcatcca agacatccgg 500
tttgaggaca acggcatcta cttctgtcag caggagtgcg gcaagacctc 550
ggaggtctac cggggctgcg gcacggagct gcgagtcatt gggttcagca 600

```

ccttggcaca gctgaagcag aggaacacgc tgaaggatgg catcatcatg 650
 atccagacgc tgctgatcat cctcttcatc 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> БЕЛОК

<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> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерное анти-супоCD79b(ch10D10)-LC антитело

<400> 240

```
acctcgggttc tatcgattga attccacccat gggatgggtca tgtatcatcc 50
tttttctagt agcaactgca actggagtag attcagatat cgtgctgacc 100
caatctccac cctctttggc tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatata 150
ctgcagagacc agtgaaagtg ttgatagtta tggcaaaact tttatgcaact 200
ggcaccagca gaaaccagga cagccaccca aactcctcat ctatcgtgta 250
tccaacctag aatctgggat ccctgccagg ttcagtggca gtgggtcaag 300
gacagacttc accctcacca ttaatcctgt ggaggctgat gatgttgcaa 350
cctattactg tcagcaaagt aatgaggatc cgttcacgtt cgggtggaggc 400
accaagctgg aaatcaaacg gaccgtggct gcaccatctg tcttcattct 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
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aagcttggcc 750
gccatggccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 800
```

<210> 241

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерное анти-супоCD79b(ch10D10)-LC антитело

<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
```

RU 2 553 566 C2

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> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерное анти-супоCD79b(ch10D10)-LC антитело

<400> 242

```

cacctcggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc 50
ctttttctag tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctgca 100
ggagtcggga cctggcctgg tgaaaccttc tcagtctctg tccctcacct 150
gcactgtcac tggctactca atcaccagtg attatgcctg gaactggatc 200
cggcagtttc caggaaacaa actggagtgg atgggcaaca tatggtacag 250
tggtagcact acctacaacc catctctcaa aagtcgaatc tctatcactc 300
gagacacatc caagaaccag ttcttcctgc agttgaattc tgtgacttct 350
gaggacacag ccacatatta ctgttcaaga atggacttct ggggtcaagg 400
caccactctc acagtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc 450
ccctggcacc ctccccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 500
tgccctggta aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc 550

```

aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct 600
 caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ctgtgccctc tagcagcttg 650
 ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa 700
 ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctt tgacaaaact cacacatgcc 750
 caccgtgccc agcacctgaa ctcttggggg gaccgtcagt cttcctcttc 800
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac 850
 atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact 900
 ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 950
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca 1000
 ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1050
 ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1100
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa 1150
 gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat cccagcgaca 1200
 tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1250
 acgcctcccg tgctggactc cgacgggtcc 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 tacaataaaa 1500

<210> 243

<211> 441

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерное анти-супоCD79b(ch10D10)-LC антитело

<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
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC-вариант тио-MAb-анти-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-MAb-анти-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)

<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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Альбумин-связывающий пептид

<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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Альбумин-связывающий пептид

<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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Альбумин-связывающий пептид

 <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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Альбумин-связывающий пептид

 <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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Альбумин-связывающий пептид

 <400> 250
 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 5 10

 <210> 251
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тиро-*huMA79b*

 <400> 251
 Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly
 5 10

 <210> 252
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тиро-*huMA79b*

 <400> 252

Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Thr
5 10

<210> 253

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-huMA79b

<400> 253

Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
5 10

<210> 254

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-huMA79b

<400> 254

Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 255

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-huMA79b

<400> 255

Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 256

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-huMA79b

<400> 256

Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 257

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-huMA79b

<400> 257

Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
5 10

<210> 258

<211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-huMA79b

 <400> 258
 Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
 5 10

 <210> 259
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 259
 Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
 5 10

 <210> 260
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 260
 Glu Val Gln Leu Cys Gln Ser Gly Ala Glu
 5 10

 <210> 261
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 261
 Val Lys Ile Ser Cys Cys Ala Thr Gly Tyr Thr
 5 10

 <210> 262
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 262
 Leu Ser Ser Leu Thr Cys Glu Asp Ser Ala Val
 5 10

 <210> 263
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 263
 Thr Ser Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
 5 10

 <210> 264
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 264
 Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
 5 10

 <210> 265
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 265
 Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
 5 10

 <210> 266
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 266
 Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
 5 10

 <210> 267
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 267
 Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
 5 10

 <210> 268
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-chMA79b

 <400> 268

Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
5 10

<210> 269

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-анти-супоCD79b(ch10D10)

<400> 269

Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Pro Gly
5 10

<210> 270

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию анти-супоCD79b(ch10D10)

<400> 270

Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Thr Gly Tyr Ser
5 10

<210> 271

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-анти-супоCD79b(ch10D10)

<400> 271

Leu Asn Ser Val Thr Cys Glu Asp Thr Ala Thr
5 10

<210> 272

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-анти-супоCD79b(ch10D10)

<400> 272

Thr Thr Leu Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 273

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тию-анти-супоCD79b(ch10D10)

<400> 273

Leu Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 274

<211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-анти-сunoCD79b(ch10D10)

 <400> 274
 Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
 5 10

 <210> 275
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-анти-сunoCD79b (ch10D10)

 <400> 275
 Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
 5 10

 <210> 276
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио анти-сunoCD79b(ch10D10)

 <400> 276
 Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
 5 10

 <210> 277
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-анти-сunoCD79b(ch10D10)

 <400> 277
 Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
 5 10

 <210> 278
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> LC-вариант тио-huMA79b

 <400> 278
 Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr
 5 10

 <210> 279
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тио--huMA79b

<400> 279
 Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
 5 10

<210> 280
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тио-huMA79b

<400> 280
 Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
 5 10

<210> 281
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тио-huMA79b

<400> 281
 Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
 5 10

<210> 282
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тио-huMA79b

<400> 282
 Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
 5 10

<210> 283
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тио-huMA79b

<400> 283
 Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
 5 10

<210> 284
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тио-huMA79b

<400> 284

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

<210> 285

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-chMA79b

<400> 285

Ser Leu Ala Val Ser Cys Gly Gln Arg Ala Thr
5 10

<210> 286

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-chMA79b

<400> 286

Glu Leu Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 287

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-chMA79b

<400> 287

Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 288

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-chMA79b

<400> 288

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 289

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC-вариант тио-chMA79b

<400> 289

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 290

<211> 11

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> LC-вариант тио-chMA79b

 <400> 290
 Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
 5 10

 <210> 291
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> LC-вариант тио-chMA79b

 <400> 291
 Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
 5 10

 <210> 292
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> LC-вариант тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)

 <400> 292
 Ser Leu Ala Val Ser Cys Gly Gln Arg Ala Thr
 5 10

 <210> 293
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)

 <400> 293
 Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
 5 10

 <210> 294
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HC-вариант тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)

 <400> 294
 Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
 5 10

 <210> 295
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> HC-вариант тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)

<400> 295

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 296

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)

<400> 296

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 297

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)

<400> 297

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 298

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-анти-cynoCD79b(ch10D10)

<400> 298

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

<210> 299

<211> 441

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC-вариант тио-анти-cynoCD79b-LC(V205C)

<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

RU 2 553 566 C2

										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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC-вариант тиро-анти-cynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C)

<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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HC-вариант тиро-анти-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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельный домен LC анти-cynoCD79b (ch10D10)

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь 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	

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь huMA79bv.18

<400> 306

Glu Val Gln Leu Val	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly
1	5	10
Gly Ser Leu Arg Leu	Ser Cys Ala Ala Ser	Gly Tyr Thr Phe Ser
	20	25
Ser Tyr Trp Ile Glu	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly Leu
	35	40
Glu Trp Ile Gly Glu	Ile Leu Pro Gly Gly	Gly Asp Thr Asn Tyr
	50	55
Asn Glu Ile Phe Lys	Gly Arg Ala Thr Phe	Ser Ala Asp Thr Ser
	65	70
Lys Asn Thr Ala Tyr	Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp
	80	85
Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys Thr Arg Arg Val	Pro Ile Arg Leu Asp
	95	100
Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val	Ser Ser Ala Ser Thr
	110	115
Lys Gly Pro Ser Val	Phe Pro Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser Thr
	125	130
Ser Gly Gly Thr Ala	Ala Leu Gly Cys Leu	Val Lys Asp Tyr Phe
	140	145
Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser	Gly Ala Leu Thr Ser
	155	160
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	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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь huMA79bv.28

<400> 307

RU 2 553 566 C2

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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь 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				

RU 2 553 566 C2

					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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь 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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяжелая цепь 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

RU 2 553 566 C2

				245					250					255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr 260	Cys	Val	Val	Val	Asp 265	Val	Ser	His	Glu	Asp 270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe 275	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 280	Gly	Val	Glu	Val	His 285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 290	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 295	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 300
Arg	Val	Val	Ser	Val 305	Leu	Thr	Val	Leu	His 310	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 320	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 325	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 330
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 335	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 340	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 345
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 350	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 355	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 360
Asn	Gln	Val	Ser	Leu 365	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 370	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 375
Asp	Ile	Ala	Val	Glu 380	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 385	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 390
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 395	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 400	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 405
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 410	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 415	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 420
Asn	Val	Phe	Ser	Cys 425	Ser	Val	Met	His	Glu 430	Ala	Leu	His	Asn	His 435
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 440	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 445	Gly				

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCTCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
 TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
 GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
 CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTTCGCGGATCTGGCAGAG
 CCCACGTTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
 CGCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
 GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
 CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
 CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
 ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
 CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
 CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
 CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
 GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
 GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCTGGACCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
 GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
 GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
 GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
 TGGTCCAGAGCCCCGAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
 CCATGGACCCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCCTCTCCCGCAACCAC
 TCCCCCCCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
 TGAGAAACCA

Фиг. 1

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
 VKMHCYMNNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
 FCQQKCNNTSEVYQCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
 LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGENHPQE

Сигнальная последовательность аминокислоты 1-28

Трансмембранный домен аминокислоты 5-25, 159-179

Домен иммуноглобулина аминокислоты 58-124

Мотив активации иммунорецептора на основе тирозина аминокислоты 193-213

Сайт N-гликозилирования аминокислоты 73-76, 101-104, 127-130, 128-131

Сайт фосфорилирования протеинкиназы C аминокислоты 49-51, 60-62, 156-158, 212-214

Сайт фосфорилирования казеинкиназы II аминокислоты 99-102, 156-159, 206-209, 221-224

Сайт фосфорилирования тирозинкиназы аминокислоты 113-120

Сайт N-миристоилирования аминокислоты 40-45, 118-123

Фиг. 2

Легкая цепь химерного антитела против человеческого CD79b (chMA79b)

CACTCCCAGCTCCAACCTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGGATGGTCATGT
 ATCATCSTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTTCAGATATCGTGCTGACCCAATC
 TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAA
 GTGTTGATTATGATGGTGATAGTTTTTTTGAAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC
 AAACCTCTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTGTAGTGGCAG
 TGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
 ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGCTCACGTTCCGGGGCAGGCACCGAGCTGGAACCTC
 AAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
 TGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
 GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGC
 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
 CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGAGTGTTAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT
 TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAG
 TTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC

Фиг. 3**Легкая цепь химерного антитела против человеческого CD79b (chMA79b)**

DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSTFLNWIYQQKPGQPPKFLIYAASNLES
 GIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALOSGNSQESVTEQDSKDS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 4**Тяжелая цепь химерного антитела против человеческого CD79b (chMA79b)**

TCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAA
 CTGCAACTGGAGTACATTTCAGAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGATGAAGCCT
 GGGGCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAGTTACTGGATAGA
 GTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAGGTG
 GTGATACTAACTACAATGAGATTTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCC
 AACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTAC
 AAGACGAGTACCGGTTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTACCCGTCTCCTCAG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA
 CAAAACCTCACATGCCCCACCGTGCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
 TCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGA
 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
 CCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
 TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
 GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT

Фиг. 5

Последовательности VL

[illegible]

по Кэбату # 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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18																						
humIII	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
MA79b	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
Гибридное huMA79b	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
huMA79b.v17	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
huMA79b.v18	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
huMA79b.v28	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
huMA79b.v32	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
			*			*	*	*	*																	*		*		*		*		*	*		*		*	

Фиг. 8А

Последовательности VN

по Кэбату # 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

		по Кэбату - CDR H3																по Чотия - CDR H3																контактирующие остатки - CDR H3															
humIII	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G																F	D	Y	W	G											
MA79b	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	R	V	P	V	Y											F	D	Y	W	G												
Гибридное huMA79b	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	V	P	V	Y											F	D	Y	W	G												
huMA79b.v17	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	V	P	V	Y											F	D	Y	W	G												
huMA79b.v18	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	V	P	I	R											L	D	Y	W	G												
huMA79b.v28	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	V	P	I	R											L	D	Y	W	G												
huMA79b.v32	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	V	P	I	R											L	D	Y	W	G												
															*		*																				*												
																F	1	2	3	4	5	6	7											8	9	10													

по Кэбату # 105 106 107 108 109 110 111 112 113

	humIII	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 13
	MA79b	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 14
Гибридное	huMA79b	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 15
	huMA79b.v17	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 170
	huMA79b.v18	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 189
	huMA79b.v28	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 208
	huMA79b.v32	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 227

Фиг. 8В

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 SEQ ID NO: 131
 K A S K S V D Y D G D S F L N SEQ ID NO: 17; SPL-2

B 1 2 3 4 5 6 7
L2 A A S N L E S SEQ ID NO: 132
 A A S N R E S SEQ ID NO: 18
 A A S N L K S SEQ ID NO: 19

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9
L3 Q Q S N E D P L T SEQ ID NO: 133
 Q Q S N S D P L T SEQ ID NO: 20; SPL-5
 Q Q S N K D P L T SEQ ID NO: 21

Фиг. 9

L2

SEQ ID NO: 132

B 1 2 3 4 5 6 7

A	A	S	N	L	E	S
A	A	R	K	L	G	R
A	A	S	R	L	E	S
A	A	R	K	L	G	N
A	A	R	K	L	K	R
A	A	R	K	L	K	S
A	A	R	K	L	A	S
A	A	G	I	L	A	R
A	A	R	K	L	R	S
A	A	R	K	L	G	S
A	A	R	H	L	K	R
A	A	S	R	L	S	R
A	A	G	S	K	L	R
A	A	S	N	R	K	S
A	A	S	K	L	G	S
A	A	R	R	L	R	T
A	A	R	R	L	R	T
A	A	R	R	L	G	R
A	A	R	Q	R	K	R
A	A	R	K	L	L	R
A	A	R	K	L	K	N
A	A	R	K	L	G	T
A	A	R	K	L	G	G
A	A	R	K	L	A	R

L2-2

L2-29

L2-38

SEQ ID NOS: 22-45

L3

SEQ ID NO: 133

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Q	Q	S	N	E	D	P	L	T
Q	Q	S	N	A	D	P	L	T
Q	Q	S	N	Q	D	P	L	T
Q	Q	S	N	E	D	P	L	T
Q	Q	S	N	D	D	P	L	T
Q	Q	S	N	L	D	P	L	T
N	N	S	N	G	D	P	L	N
Q	P	D	N	E	A	R	L	T
D	Q	R	N	A	D	P	L	T

SEQ ID NOS: 46-53

H1

SEQ ID NO: 134

D 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E
G	Y	P	F	T	R	Y	W	I	S
G	Y	P	F	T	S	Y	W	I	Q
G	Y	P	F	T	S	Y	W	I	N
G	Y	P	F	T	R	Y	W	I	N
G	Y	T	F	N	R	Y	W	I	N
G	Y	S	I	F	K	S	Y	W	I
P	Y	S	I	C	T	Y	F	I	D
G	Y	Y	F	T	S	Y	W	I	E
G	Y	P	F	F	G	R	Y	W	V
G	Y	T	F	F	K	K	Y	W	I
G	Y	P	F	F	T	S	Y	W	I
G	Y	P	F	F	R	R	Y	W	I
G	Y	P	V	G	R	Y	W	I	S
G	Y	P	F	F	N	R	Y	W	I
G	Y	G	F	T	T	S	Y	W	I
G	Y	T	F	T	T	S	Y	W	I
G	Y	T	F	T	T	S	Y	W	I
G	Y	T	F	S	G	Y	W	I	N
G	Y	T	F	F	R	R	Y	W	I
G	Y	S	I	F	R	S	Y	W	I
G	Y	S	S	F	R	R	Y	W	I
G	Y	S	S	F	P	S	Y	W	L
G	Y	P	F	F	T	R	Y	W	I
G	Y	P	F	F	S	G	Y	W	I
G	Y	P	F	F	R	S	Y	W	I
G	Y	P	F	F	R	G	Y	W	I
G	Y	P	F	F	N	G	Y	W	I
G	Y	N	V	S	S	Y	W	L	S
G	F	P	F	T	S	Y	W	I	S
G	F	P	F	N	R	Y	W	I	N

H1-6

H1-7

SEQ ID NOS: 54-86

H3

SEQ ID NO: 107

F 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

C	T	R	R	V	P	V	Y	F	D
C	T	R	R	V	P	I	Y	L	D
C	T	R	R	V	P	V	Y	F	D
C	T	R	R	V	P	V	K	L	D
C	T	R	R	V	P	V	Y	L	D
C	T	R	R	V	P	I	Y	F	D
C	T	R	R	V	P	F	C	L	D
C	T	R	R	V	P	V	Y	L	D
C	T	R	R	V	P	I	R	L	D
C	T	R	R	V	P	I	R	F	D
C	T	R	R	V	P	I	Y	F	D
C	T	R	R	V	P	V	Y	F	S
C	T	R	R	V	P	V	V	L	D
C	T	R	R	V	P	V	V	L	D
C	T	R	R	V	P	V	R	F	D
C	T	R	R	V	P	V	V	E	L
C	T	R	R	V	P	I	Y	L	D
C	T	R	R	V	P	I	Y	F	D
C	T	R	R	V	P	V	C	L	D
C	T	R	R	I	P	V	Y	F	D

H3-12

H3-10

SEQ ID NOS: 87-106

Фиг. 10

IgG-вариант MA79b	Biacore KD (нМ)		Иммобилизованный антиген
	Fab	IgG	
MA79b	200	2	hu CD79b.ecd-Fc
		4.7	hu CD79b.ecd
Гибрид huMA79b		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	16-мерный пептид

Фиг. 11

		Остатки каркасной области мышинного антитела										Изменения для придания стабильности в VL				Кратность связывания двухвалентного антитела	
Каркасная область (FW) IgG-варианта huMA79b		VL		VH												Последова- тельность CDR-H3	Kd вариант/ Kd химера
		4	47	48	67	69	71	73	75	78	80	28	29	94	95		
Все каркасные остатки гибрида huMA79		4	47	48	67	69	71	73	75	78	80					дикого типа	56
1																дикого типа	1
2		47														дикого типа	9.4
3					67	69	71	73	75	78	80					дикого типа	18
4																дикого типа	5.5
5																дикого типа	12
6																дикого типа	3.5
7																дикого типа	7.6
8																дикого типа	3.5
9																дикого типа	1.7
10																дикого типа	1.8
11																дикого типа	NA
12																H3-10	0.6
13																H3-10	0.5
14																дикого типа	1.8
15																дикого типа	1.1
16																дикого типа	0.8
17																дикого типа	1.6
18																дикого типа	1.0
19																H3-10	0.4
20																H3-10	NDB
21																H3-10	NDB
22																H3-10	NDB
23																H3-10	25
24																H3-10	NDB
25																H3-10	NDB
26																H3-10	NDB
27																H3-10	
28																H3-10	0.8
29																H3-10	Очень слабое
30																H3-10	1.3
31																H3-10	1.0
32																H3-10	1.6
33																H3-10	Очень слабое
34																H3-10	NDB

Фиг. 12

I					
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
II					
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
III					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Акцептор					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Второй акцептор					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	

Фиг. 13A

I					
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 108	
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 109	
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 110	
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 111	
II					
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 112	
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 113	
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 114	
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 115	
III					
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 116	
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 117	
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 118	
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 119	
Акцептор					
A	RFTISADTISKNTAYLQMN SLRAEDТАVYYCSR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 120	
B	RFTISADTISKNTAYLQMN SLRAEDТАVYYCSR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 121	
C	RFTISADTISKNTAYLQMN SLRAEDТАVYYCS	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 122	
Второй акцептор					
A	RFTISADTISKNTAYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 123	
B	RFTISADTISKNTAYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 124	
C	RFTISADTISKNTAYLQMN SLRAEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 125	
D	RFTISADTISKNTAYLQMN SLRAEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 126	

Фиг. 13B

kv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLIY	-L2-	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
kv2	DIVMTQSPFLSLPVTGPGEPAISIC	-L1-	WYLQKPGQSPQLLIY	-L2-	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE
kv3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	-L1-	WYQQKPGQAPRLLIY	-L2-	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
kv4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	-L1-	WYQQKPGQPPKLLIY	-L2-	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ

PEDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 127
AEDVGVIYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 128
PEDFAVIYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 129
AEDVAVIYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 130

Фиг. 14

А. Легкая цепь huMA79b.v17

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 152)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 153)
 FR3-LC: GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 154)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 155)
 HVR1-LC: KASQSVDDYDGDSTFLN (SEQ ID NO: 156)
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 157)
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 158)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)

Легкая цепь:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGDSTFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 303)

Вариабельный домен LC:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGDSTFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 169)

В. Тяжелая цепь huMA79b.v17

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 160)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 161)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 162)
 FR4-HC: WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 163)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 164)
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 165)
 HVR3-HC: TRRVFVYFDY (SEQ ID NO: 166)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 167)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 168)

Тяжелая цепь:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 304)

Вариабельный домен HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 170)

Фиг. 15

A. Легкая цепь huMA79b.v18

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 171)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 172)
 FR3-LC: GVPSPRFGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYC (SEQ ID NO: 173)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 174)
 HVR1-LC: KASQSVDDYDGDSTFLN (SEQ ID NO: 175)
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 176)
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 177)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 178)

Легкая цепь:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGDSTFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS
 GSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 305)

Вариабельный домен LC:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGDSTFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS
 GSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 188)

B. Тяжелая цепь huMA79b.v18

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 179)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 180)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 181)
 FR4-HC: WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 182)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 183)
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 184)
 HVR3-HC: TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 185)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 186)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 187)

Тяжелая цепь:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 306)

Вариабельный домен HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 189)

Фиг. 16

A. Легкая цепь huMA79b.v28

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTC (SEQ ID NO: 190)
 FR2-LC: WYQOKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 191)
 FR3-LC: GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 192)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 193)
 HVR1-LC: KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 194)
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 195)
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 196)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 197)

Легкая цепь

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTCKASQSVDYEGDSFLNWWYQOKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 307)

B. Тяжелая цепь huMA79b.v28

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 198)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 199)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 200)
 FR4-HC: WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 201)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 202)
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 203)
 HVR3-HC: TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 204)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 205)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYS
 YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 206)

Тяжелая цепь:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 308)

Фиг. 17

A. Легкая цепь huMA79b.v32

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 209)
 FR2-LC: WYQOKPGKAPKLFYIY (SEQ ID NO: 210)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYC (SEQ ID NO: 211)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 212)
 HVR1-LC: KASQSVSDYSGDSFLN (SEQ ID NO: 213)
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 214)
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 215)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 216)

Легкая цепь:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYSGDSFLNWKYQOKPGKAPKLFYIYAASNLESGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 309)

Вариабельный домен LC:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYSGDSFLNWKYQOKPGKAPKLFYIYAASNLESGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 226)

B. Тяжелая цепь huMA79b.v32

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 217)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 218)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 219)
 FR4-HC: WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 220)
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 221)
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 222)
 HVR3-HC: TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 223)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 224)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 225)

Тяжелая цепь:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 310)

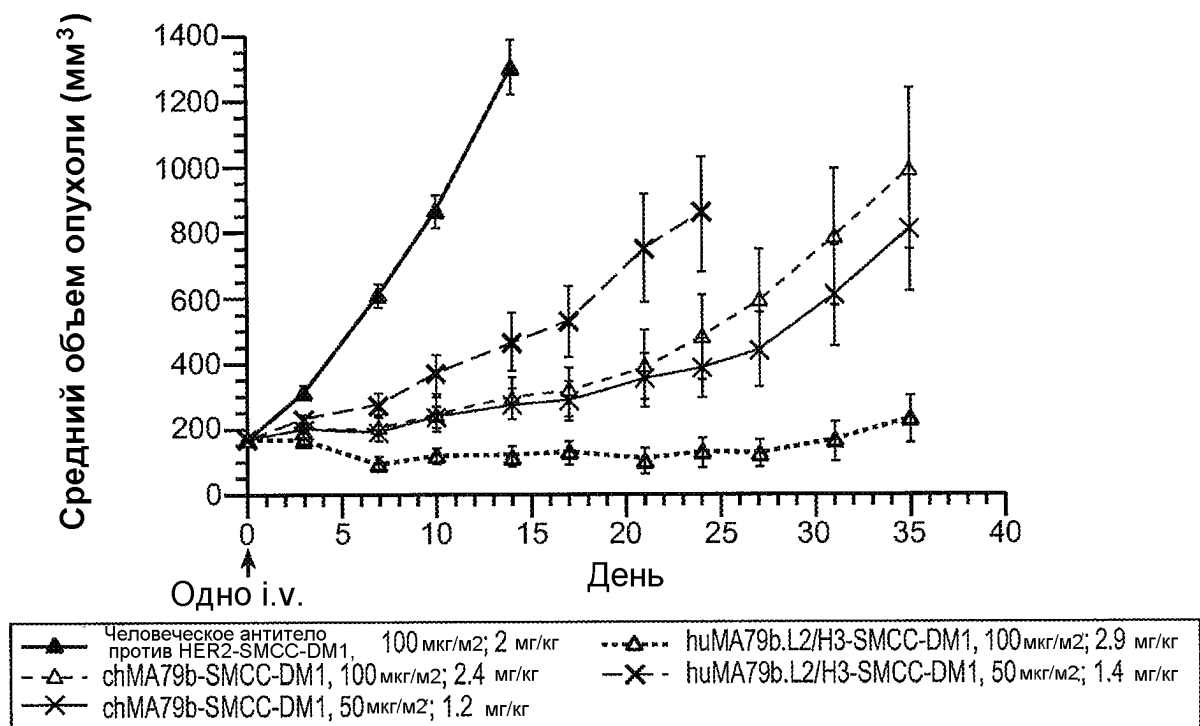
Вариабельный домен HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 227)

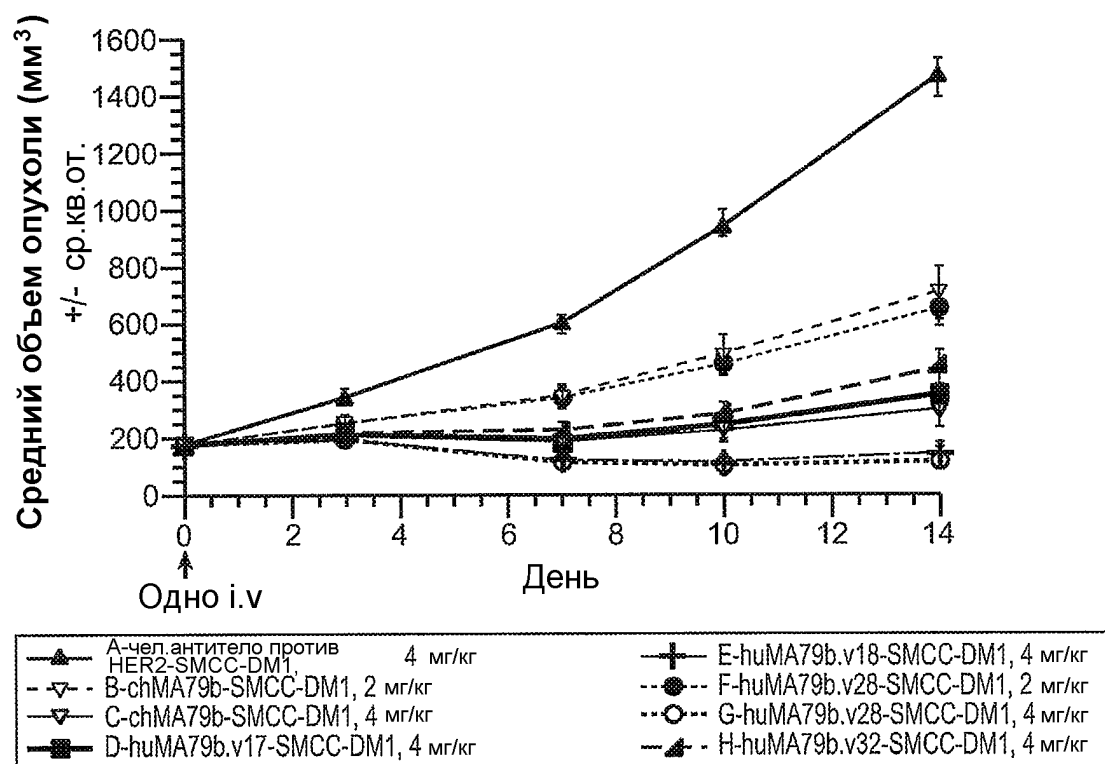
Фиг. 18

		Сигнальная последовательность		Тестируемый пептид												
hCD79b	1	MARLALSPVP		SHWLVALLLLLSAEP	-VPAAR	SEDRYRNP	KG	SACSR	IWQS	49						
CynCD79b	1	MARLALSPV		SSHWLVALLLLLSAEP	VPAAK	SEDLYPNP	KG	SACSR	IWQS	50						
mCD79b	1	MATLVLS		SMPCHWLLFLLLLF	FS	GEP	-VPAMTSSDLP	LN	FQGS	PC	SI	WQH	49			
hCD79b	50	PRFIARKRGFTVKMHCYMN		-S	ASGNVSWLWKQ	EMDEN	PQOL	KLE	KGR	MEE	98					
CynCD79b	51	PRFIARKRGFTVKMHCY		VTN	STFSIVSWLRK	RET	DKEP	QOVN	LE	QGH	MHO	100				
mCD79b	50	PRFAAKKR		SSMVKFFHCYT	N--H	S	GALTWFRK	RGS	QOQ	OE	LVSE	ECR	I	V	96	
hCD79b	99	S		QNESLATLTIQ	G	IRFEDNGIYFCQ	QKCN	-NTSEVY	Q	CGGT	ELRV	MGF	ST	147		
CynCD79b	101	TQNS		SVTTLTIQ	D	IRFEDNGIYFCQ	QEC	S	-KTSEVY	R	CGGT	ELRV	MGF	ST	149	
mCD79b	97	TQNG		SVYTTLTIQ	N	QYEDNGIYFC	KQK	CDS	ANHN	V	TDS	CGTE	LLV	L	GFST	146
Домен TM																
hCD79b	148	LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFII		VIPIFLLLLDKDD	SKAGME	E	DH	TYE	197							
CynCD79b	150	LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFII		VIPIFLLLLDKDD	SKAGME	A	DH	TYE	199							
mCD79b	147	LDQLKQRNTLKDGIIL		LIQTLLIILFII	VIPIFLLLLDKDD	G	KAGME	E	DH	TYE	196					
Домен ITAM																
hCD79b	198	GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE					229	SEQ ID NO: 2								
CynCD79b	200	GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE					231	SEQ ID NO: 7								
mCD79b	197	GLNIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE					228	SEQ ID NO: 8								

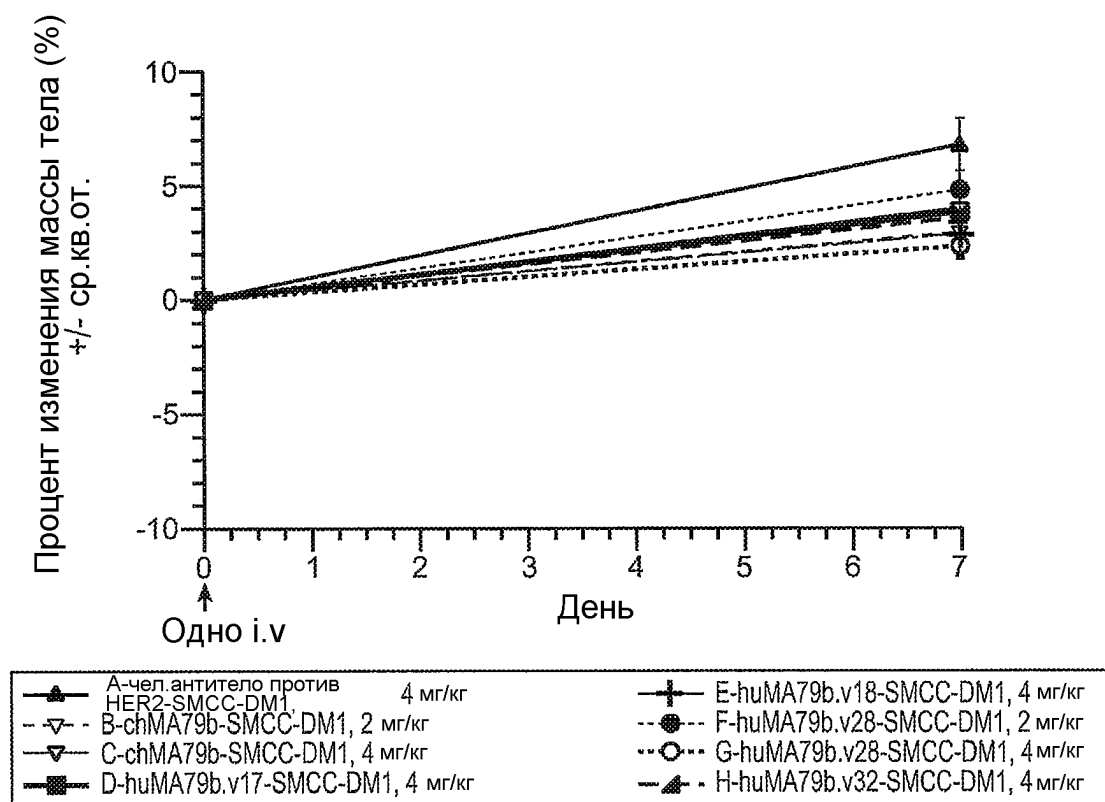
Fig. 19



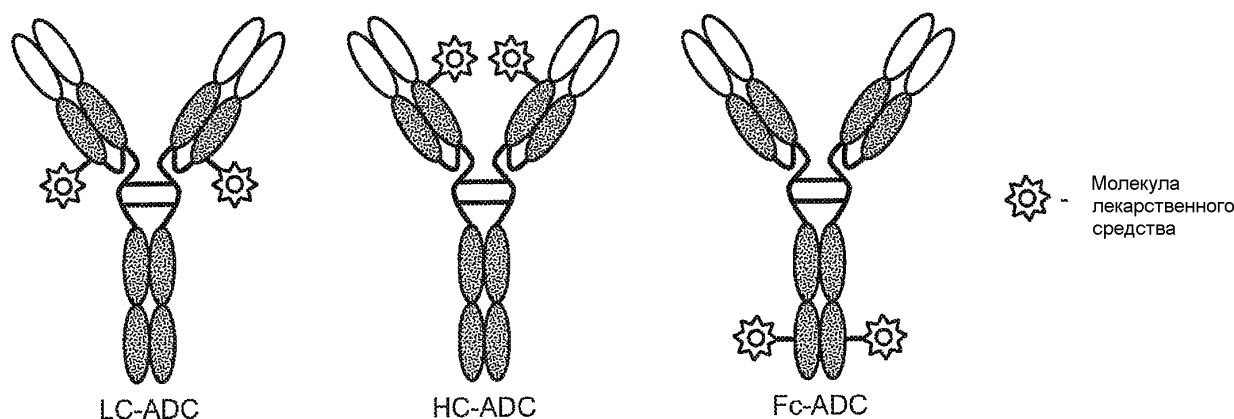
Фиг. 20



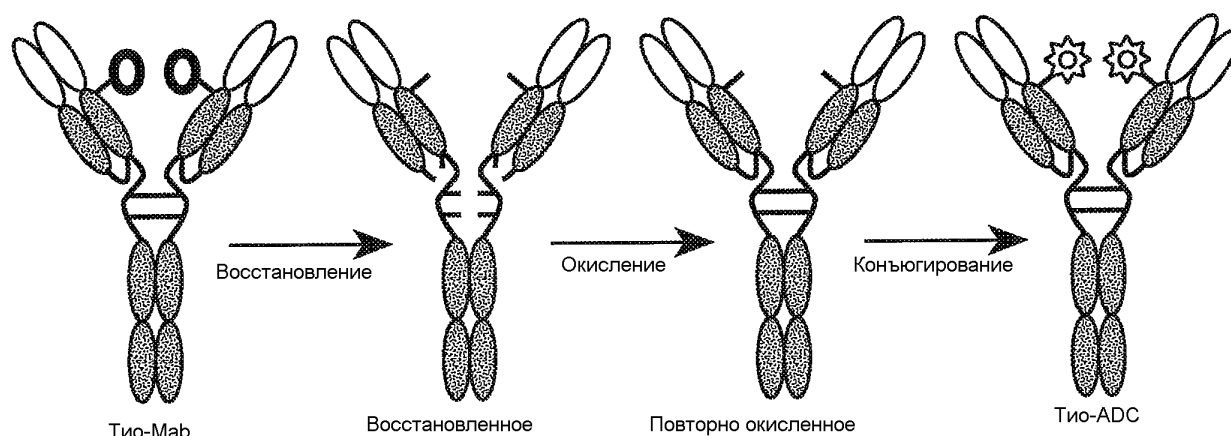
Фиг. 21А



Фиг. 21В



Фиг. 22



Фиг. 23

Тяжелая цепь сконструированного на основе цистеина анти-CD79b A118C huMA79b.v17 тιο-MAb

А. Последовательность легкой цепи тιο-huMA79b.v17-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGSFLNWIYQKPGKAPKLLIYAASNLESQVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 229)

В. Последовательность тяжелой цепи тιο-huMA79b.v17-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSAD
 TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLTVTVSSCSTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
 CDKHTTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTFLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 228)

Фиг. 24

**Тяжелая цепь сконструированного на основе цистеина
анти-CD79b A118C huMA79b.v18 тио-MAb**

A. Последовательность легкой цепи тио-huMA79b.v18-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVDDYDGDSTFLNWWYQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSCTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 231)

B. Последовательность тяжелой цепи тио-huMA79b.v18-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVP IRLDYWGQGTLLTVVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 230)

Фиг. 25

**Тяжелая цепь сконструированного на основе цистеина
анти-CD79b A118C huMA79b.v28 тио-MAb**

A. Последовательность легкой цепи тио-huMA79b.v28-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVDDYEGDSTFLNWWYQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSCTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 233)

B. Последовательность тяжелой цепи тио-huMA79b.v28-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVP IRLDYWGQGTLLTVVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 232)

Фиг. 26

Легкая цепь сконструированного на основе цистеина анти-CD79b V205C chMA79b тио-MAb

A. Последовательность легкой цепи тио-chA79b-LC-V205C (LC)

DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSTFLNWIYQQKPGQPPKLFYIYAASNLESGIPARFSGS
GGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 235)

B. Последовательность тяжелой цепи тио-chMA79b-LC-V205C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 234)

Фиг. 27

Тяжелая цепь сконструированного на основе цистеина анти-CD79b A118C chMA79b тио-MAb

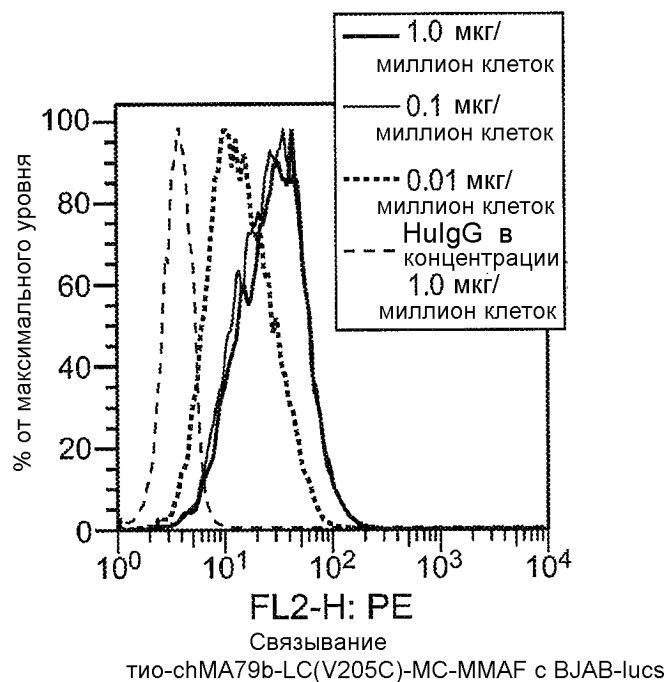
A. Последовательность легкой цепи тио-chMA79b-HC-A118C (LC)

DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSTFLNWIYQQKPGQPPKLFYIYAASNLESGIPARFSGS
GGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 237)

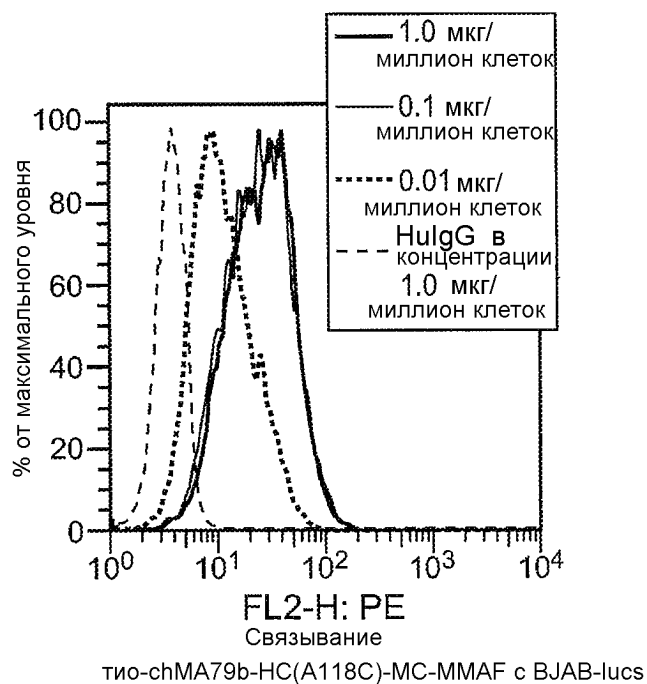
B. Последовательность тяжелой цепи тио-chMA79b-HC-A118C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGGQTSVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 236)

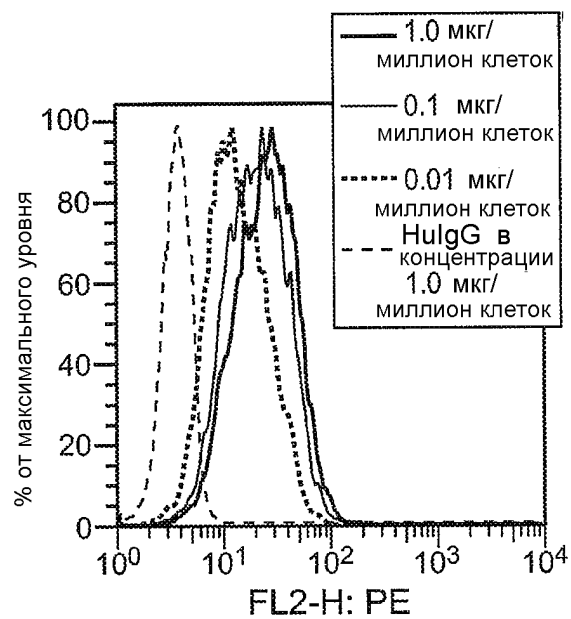
Фиг. 28



Фиг. 29А

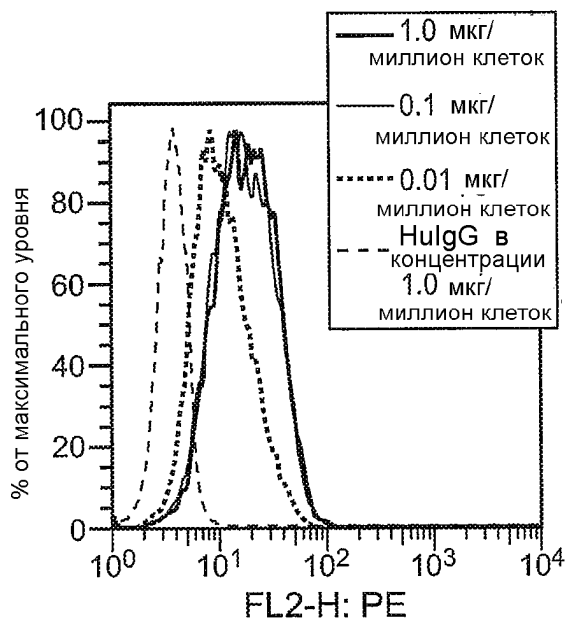


Фиг. 29В



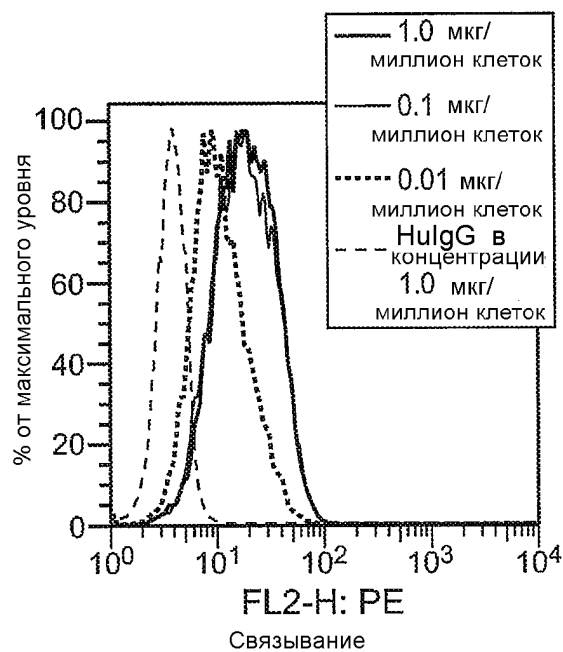
Связывание «оголенного»
тио-MA79b.v18-NC(A118C) с BJAB-luc8

Фиг. 30А

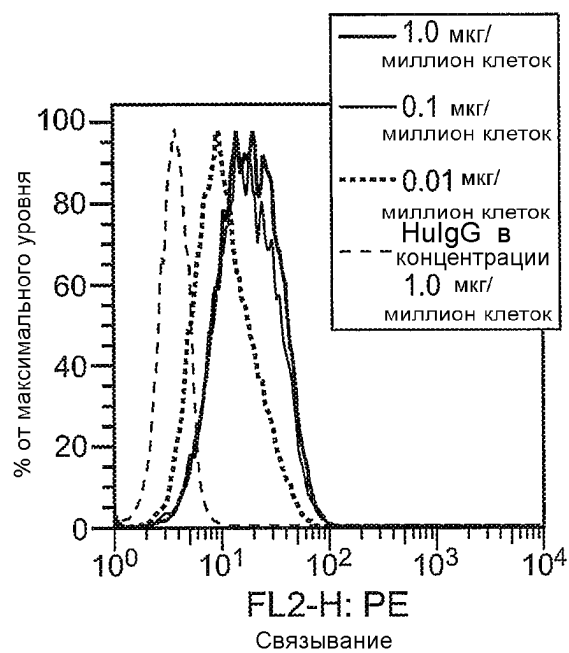


Связывание
тио-MA79b.v18-NC(A118C)-MC-MMAF с BJAB-luc8

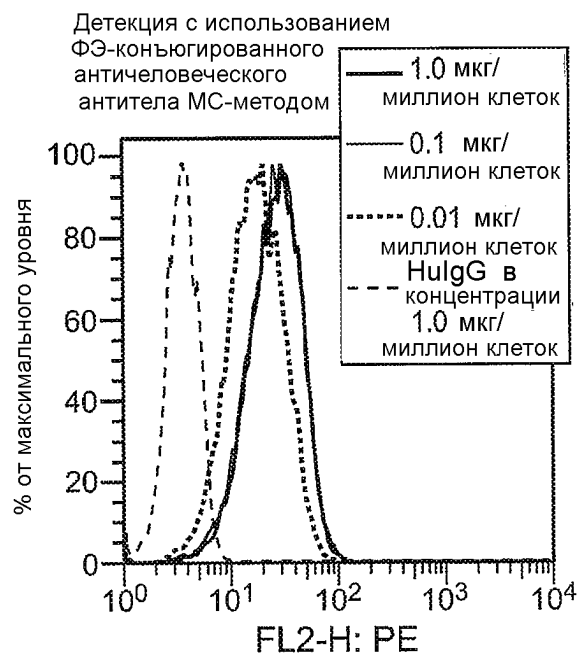
Фиг. 30В



Фиг. 30C

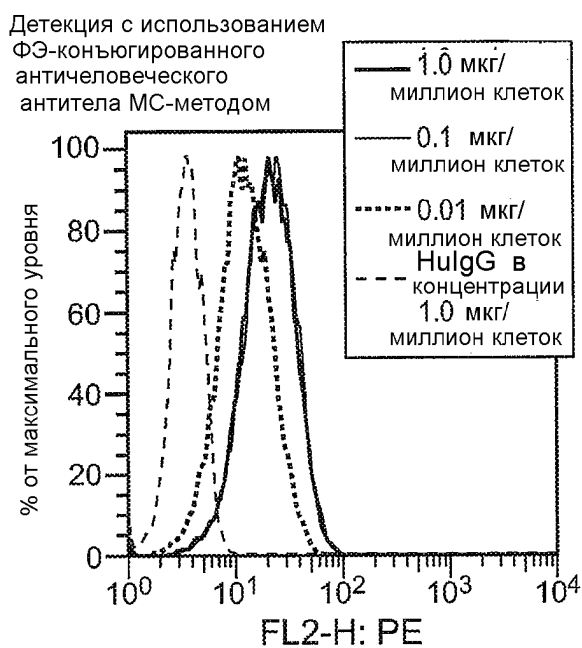


Фиг. 30D



Связывание «оголенного»
тио-MA79b.v28-HC(A118C) с BJAB-lucs

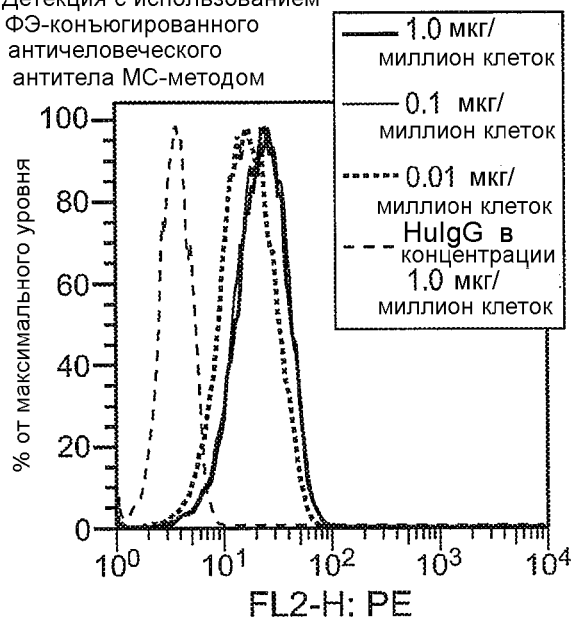
Фиг. 31А



Связывание тию-MA79b.
v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE с BJAB-lucs

Фиг. 31В

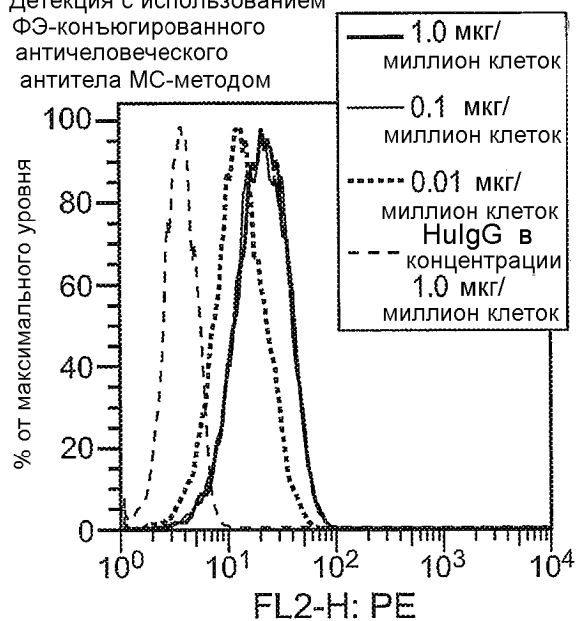
Детекция с использованием
ФЭ-конъюгированного
античеловеческого
антитела MC-методом



Связывание тино-МА79b.
v28-NC(A118C)-BMPEO-DM1 с BJAB-lucs

Фиг. 31C

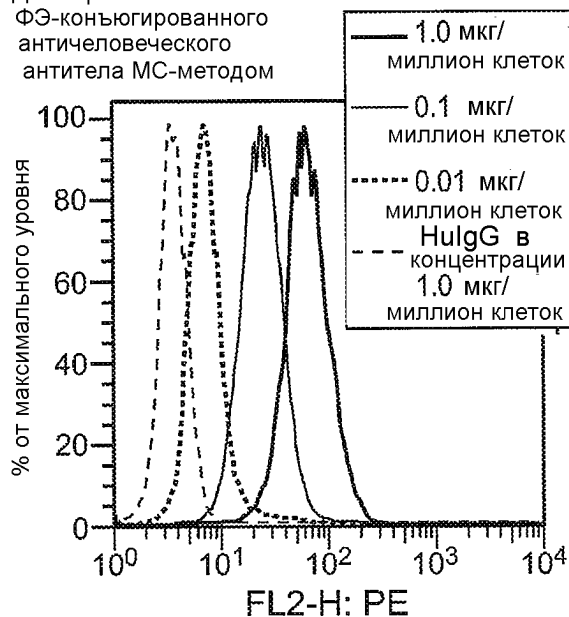
Детекция с использованием
ФЭ-конъюгированного
античеловеческого
антитела MC-методом



Связывание тино-МА79b.
v28-NC(A118C)-MC-MMAF с BJAB-lucs

Фиг. 31D

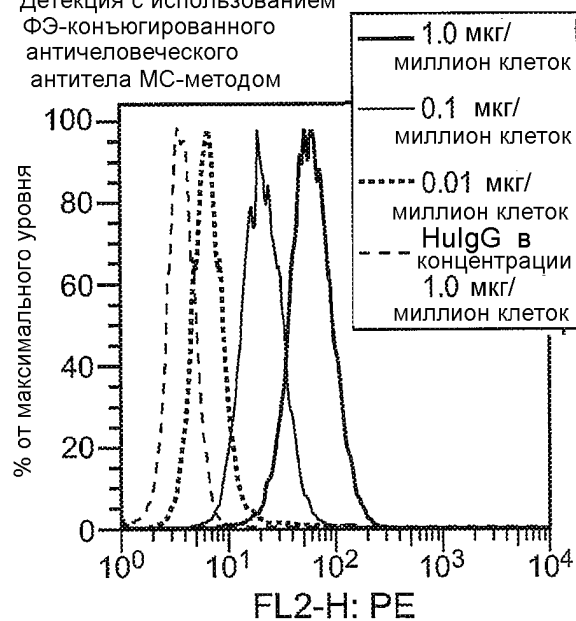
Детекция с использованием
ФЭ-конъюгированного
античеловеческого
антитела МС-методом



Связывание «оголенного» тимо-анти-
супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C) с клетками BJA-B,
экспрессирующими CD79b собакоподобных обезьян

Фиг. 32А

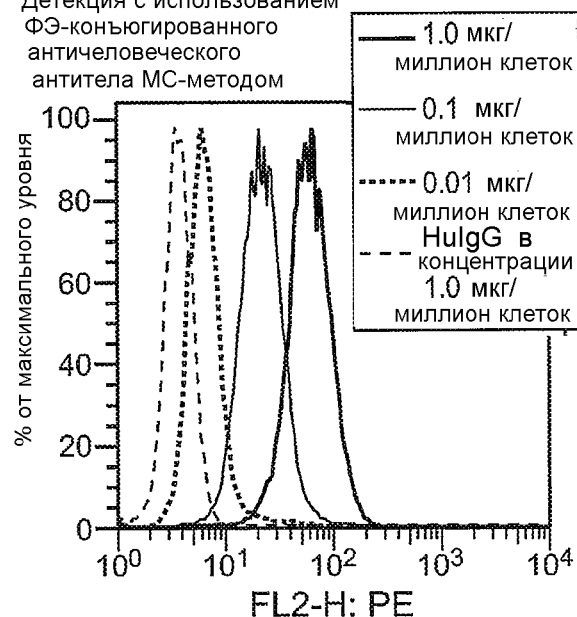
Детекция с использованием
ФЭ-конъюгированного
античеловеческого
антитела МС-методом



Связывание тимо-анти-супоCD79b(ch10D10)-НС(A118C)-
МСvсРАВ-ММАЕ с клетками BJA-B, экспрессирующими
CD79b собакоподобных обезьян

Фиг. 32В

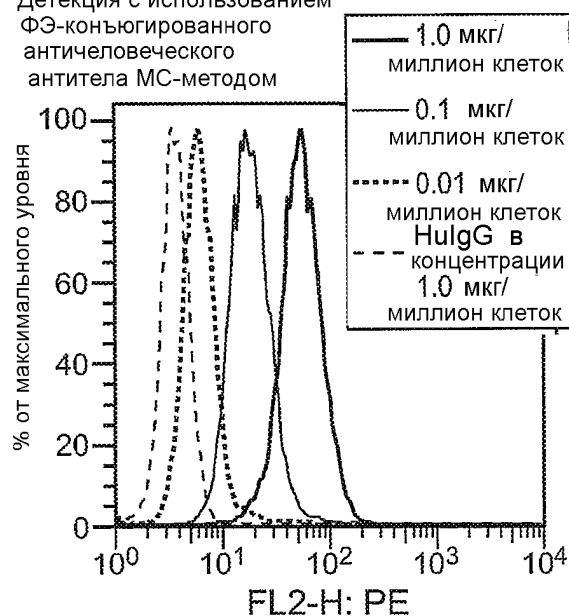
Детекция с использованием
ФЭ-конъюгированного
античеловеческого
антитела МС-методом



Связывание тимо-анти-супоCD79b(ch10D10)-
НС(A118C)-BMPEO-DM1 с клетками VJAB, экспрессирующими
CD79b собакоподобных обезьян

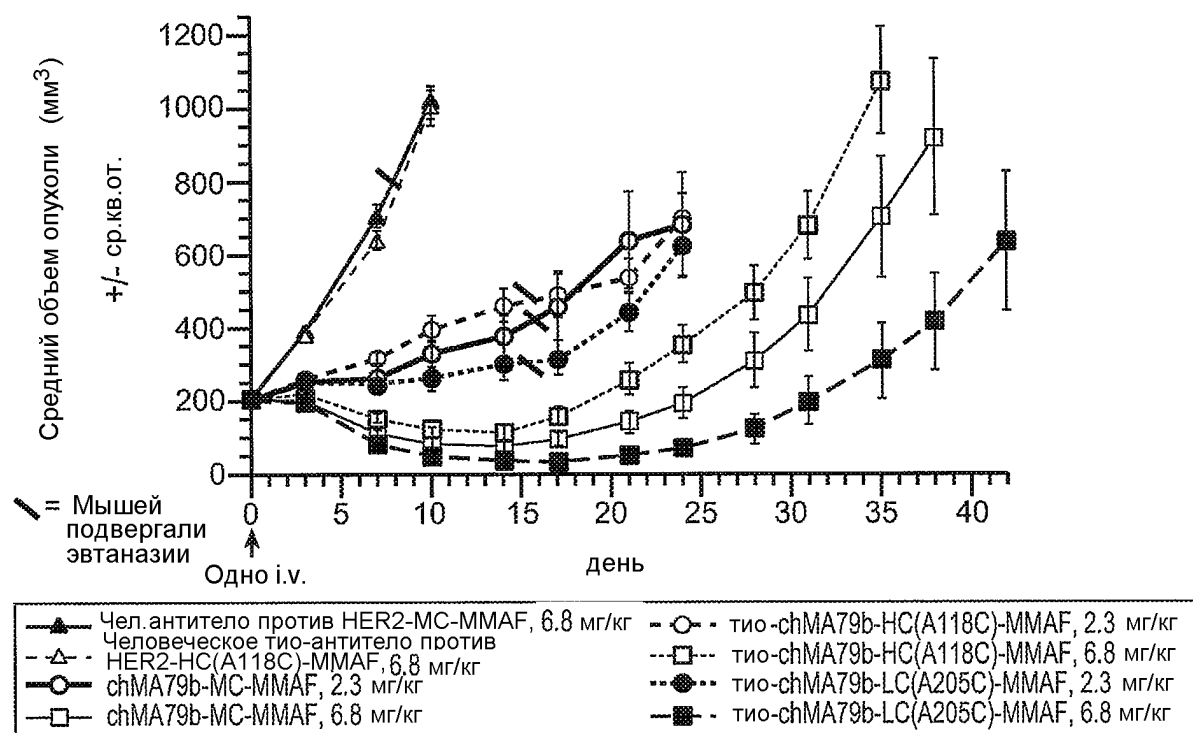
Фиг. 32C

Детекция с использованием
ФЭ-конъюгированного
античеловеческого
антитела МС-методом

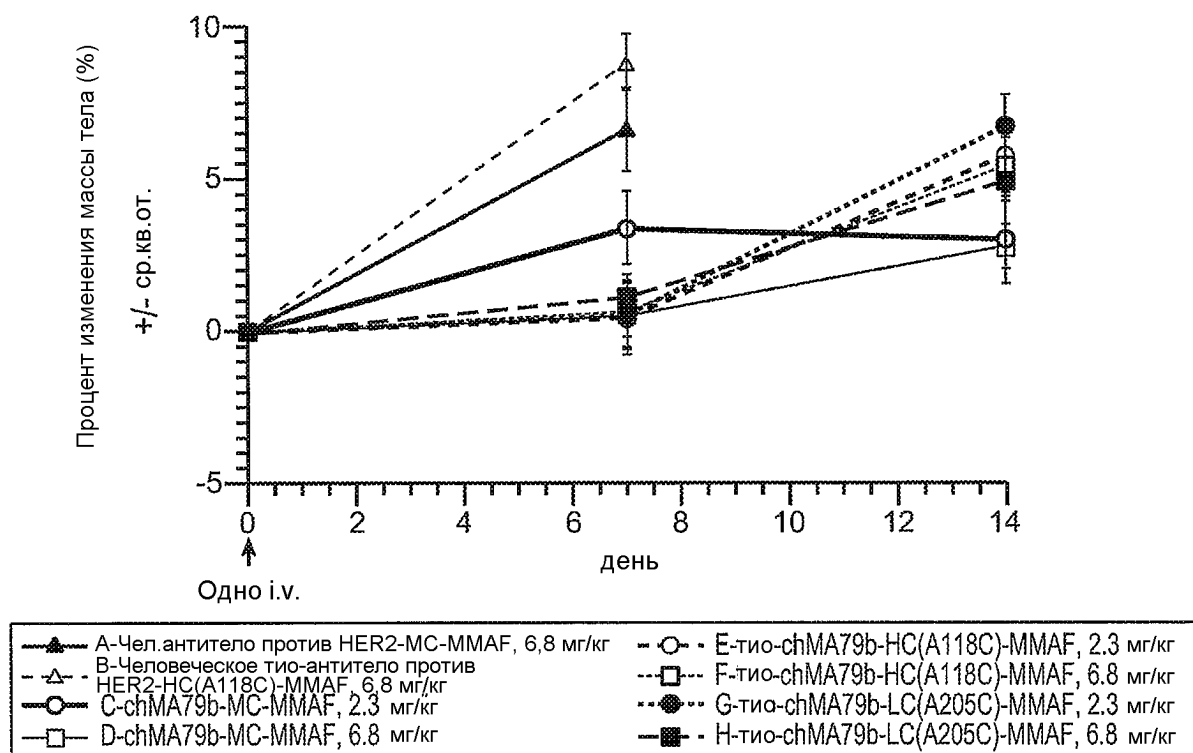


Связывание тимо-анти-супоCD79b(ch10D10)-
НС(A118C)-МС-MMAF с клетками VJAB,
экспрессирующими CD79b собакоподобных обезьян

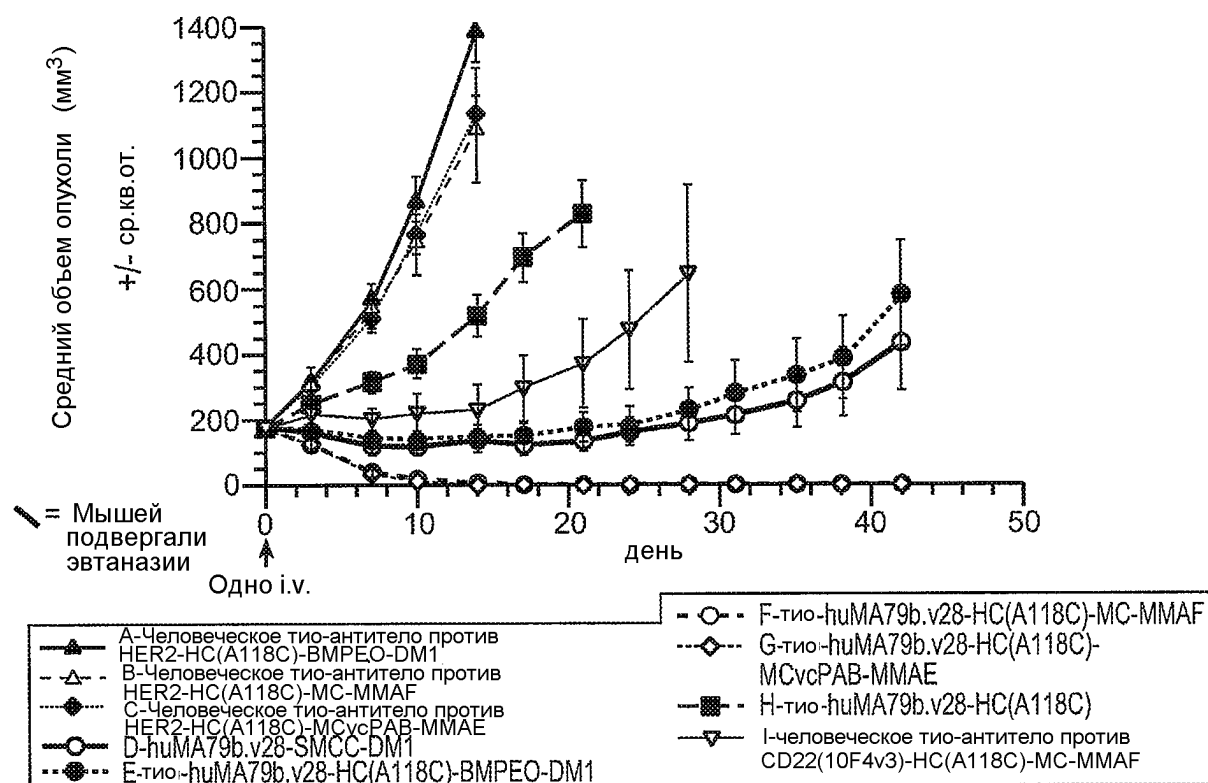
Фиг. 32D



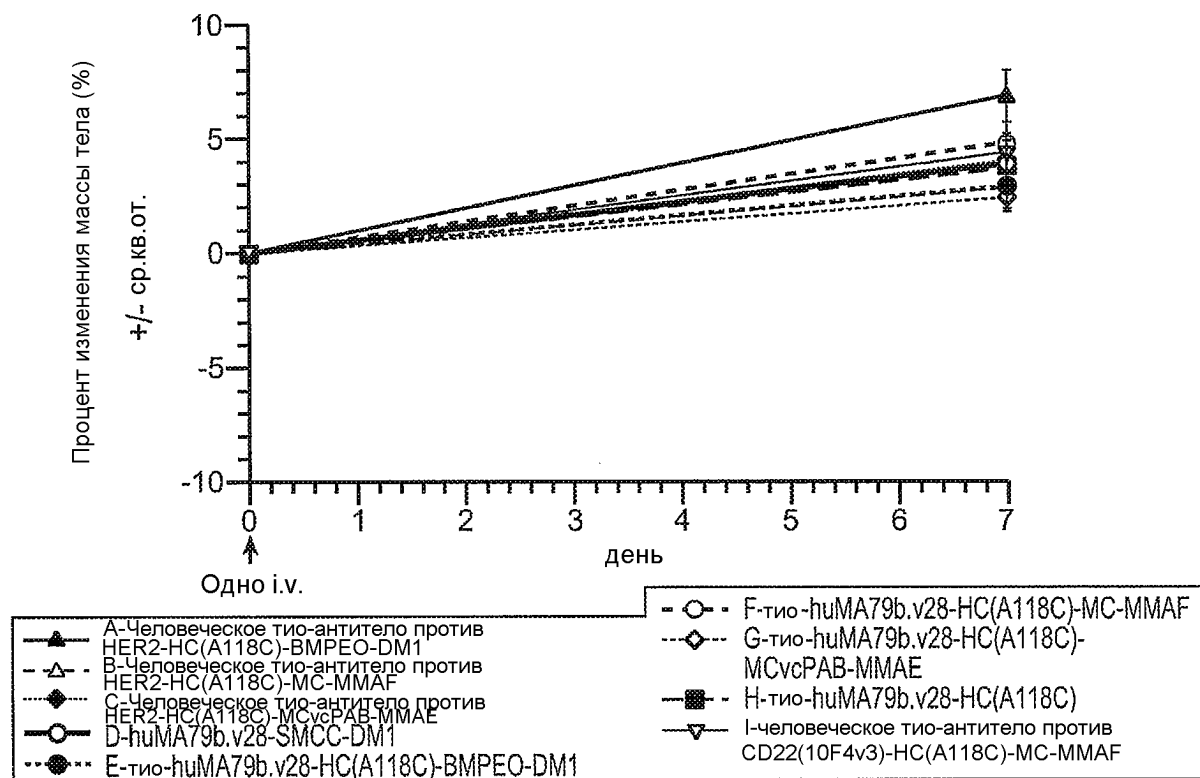
Фиг. 33А



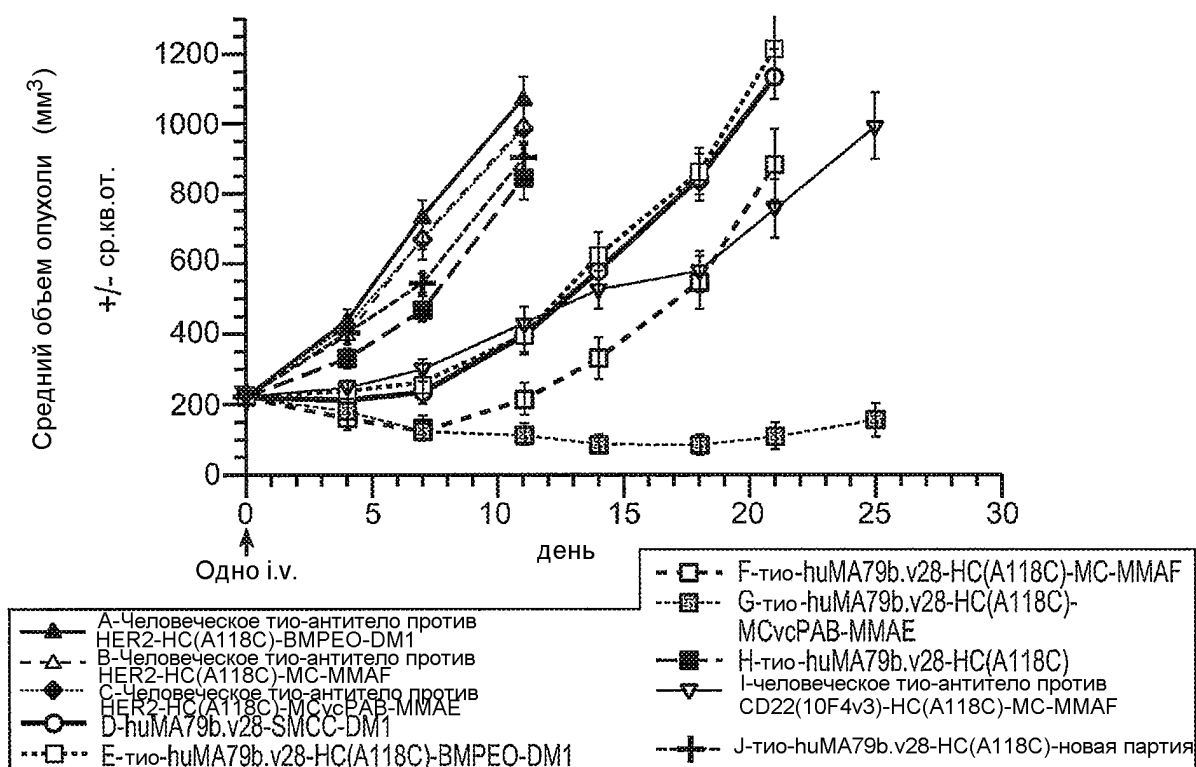
Фиг. 33В



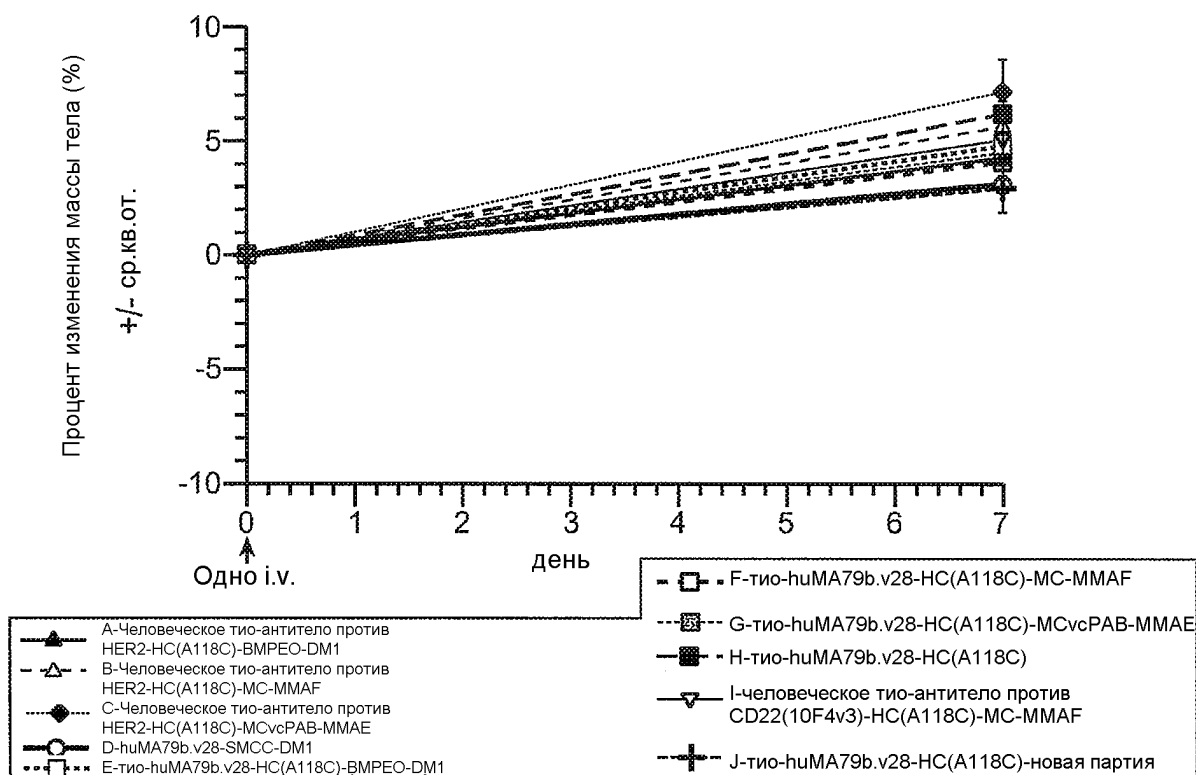
Фиг. 34А



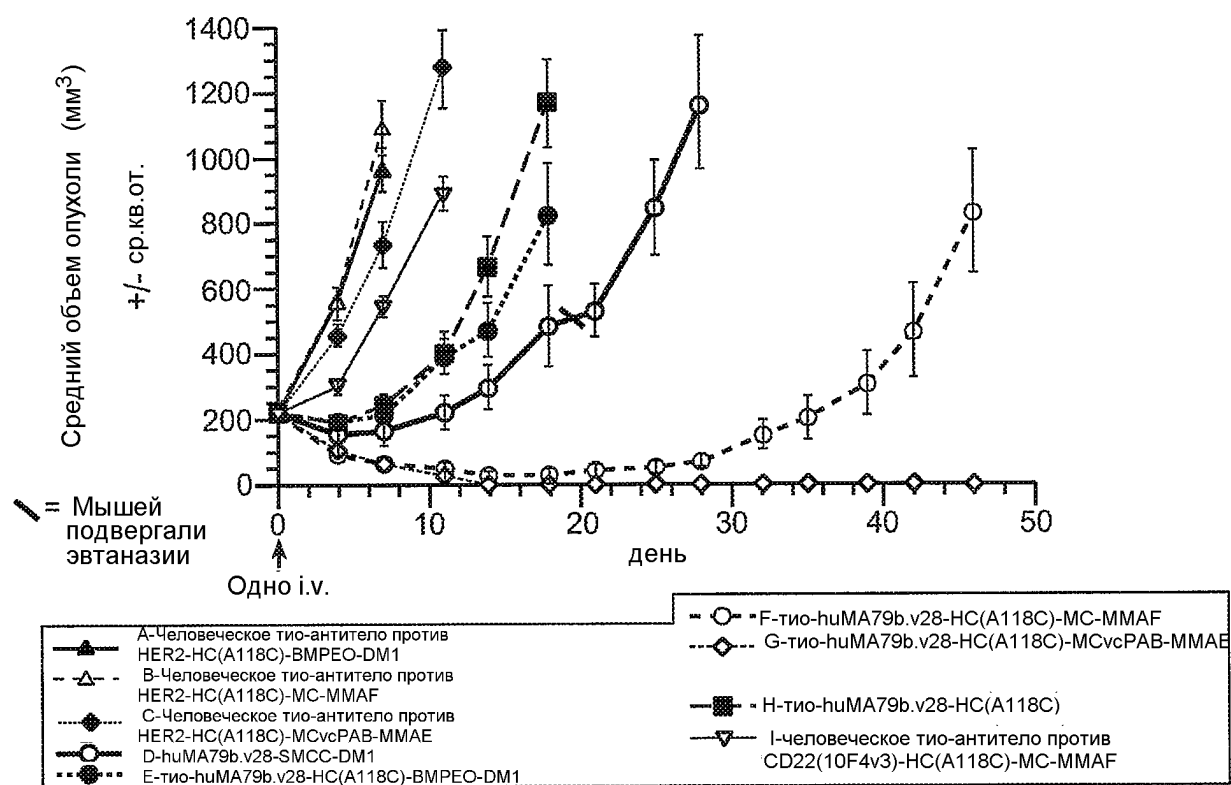
Фиг. 34В



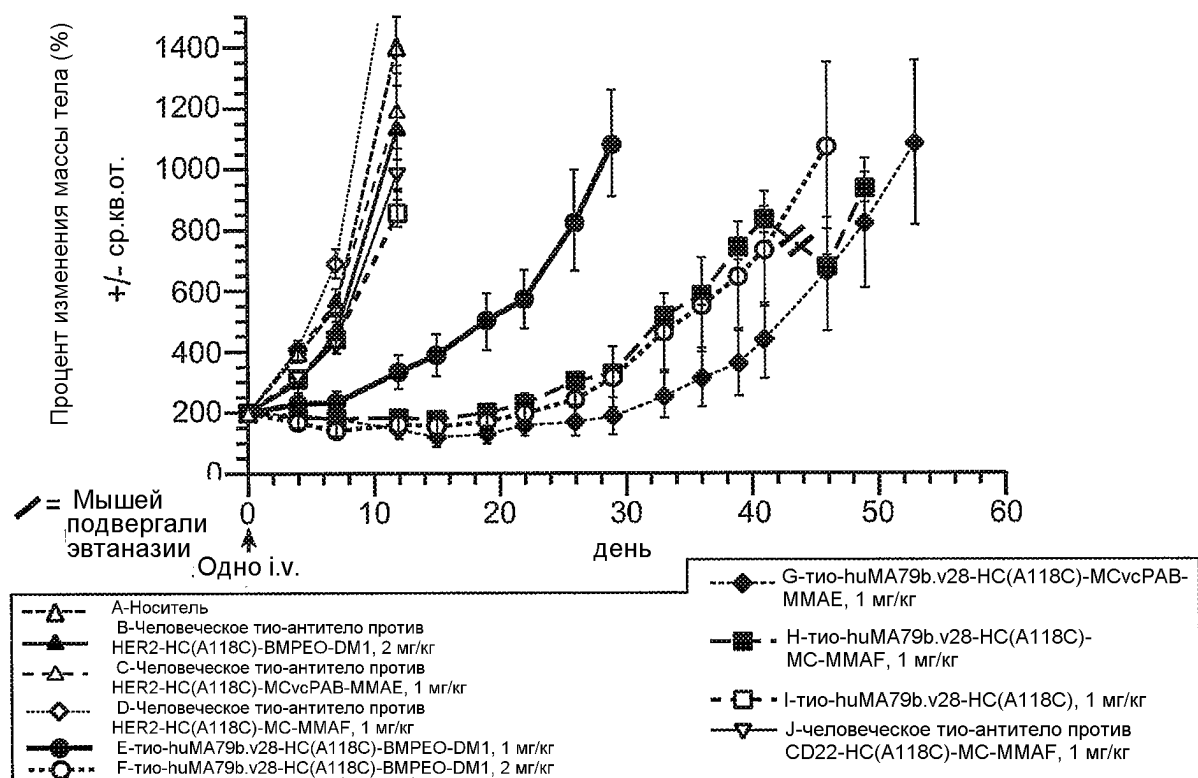
Фиг. 35А



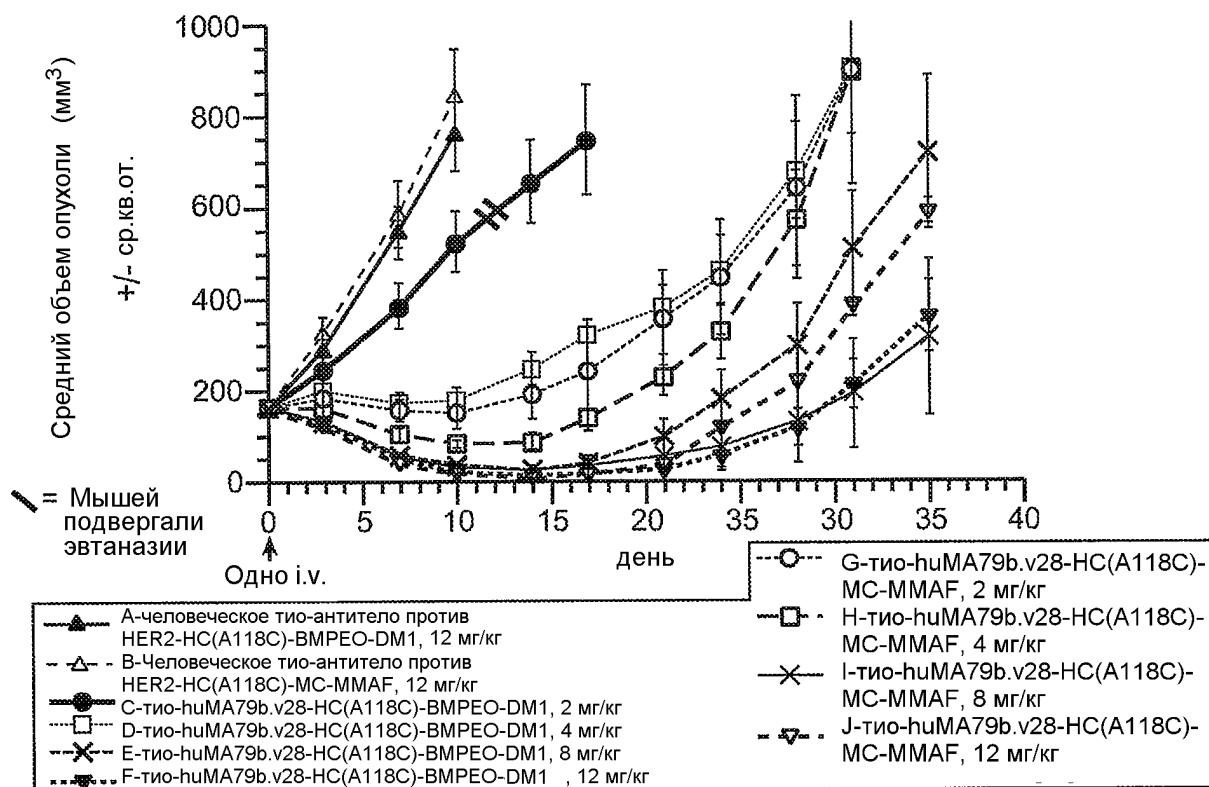
Фиг. 35В



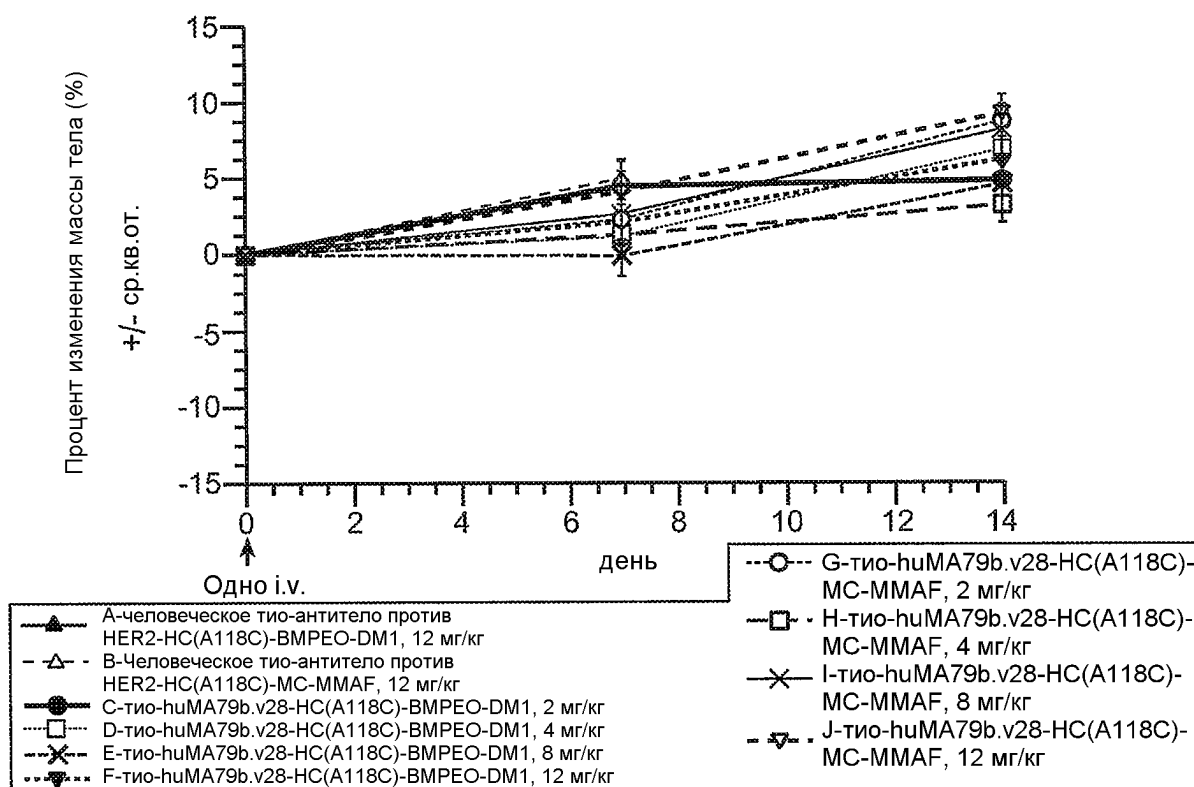
Фиг. 36



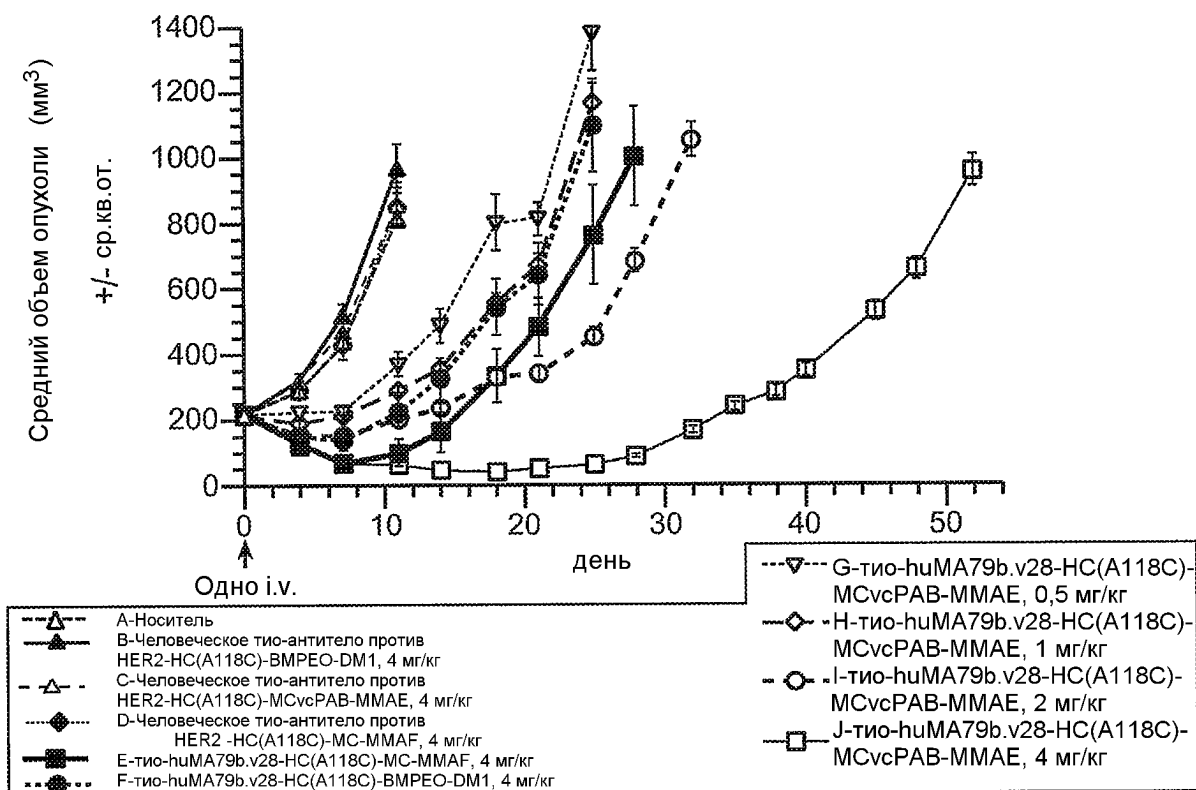
Фиг. 37



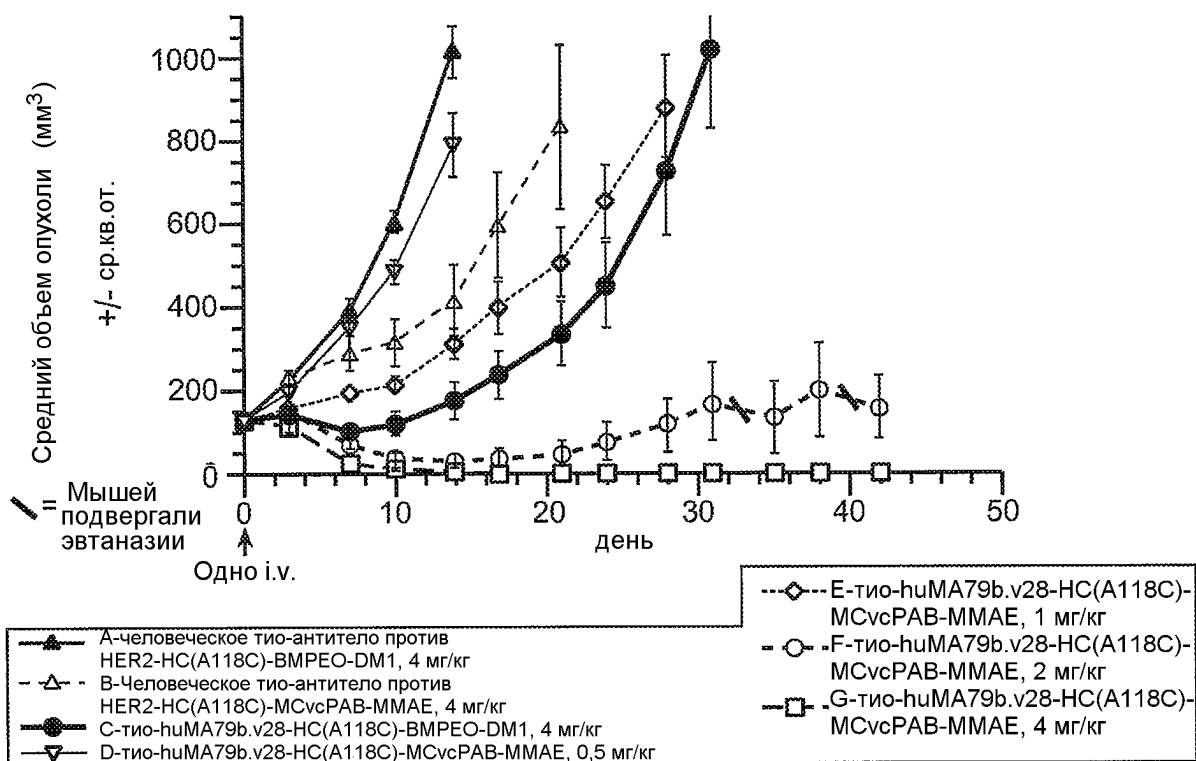
Фиг. 38А



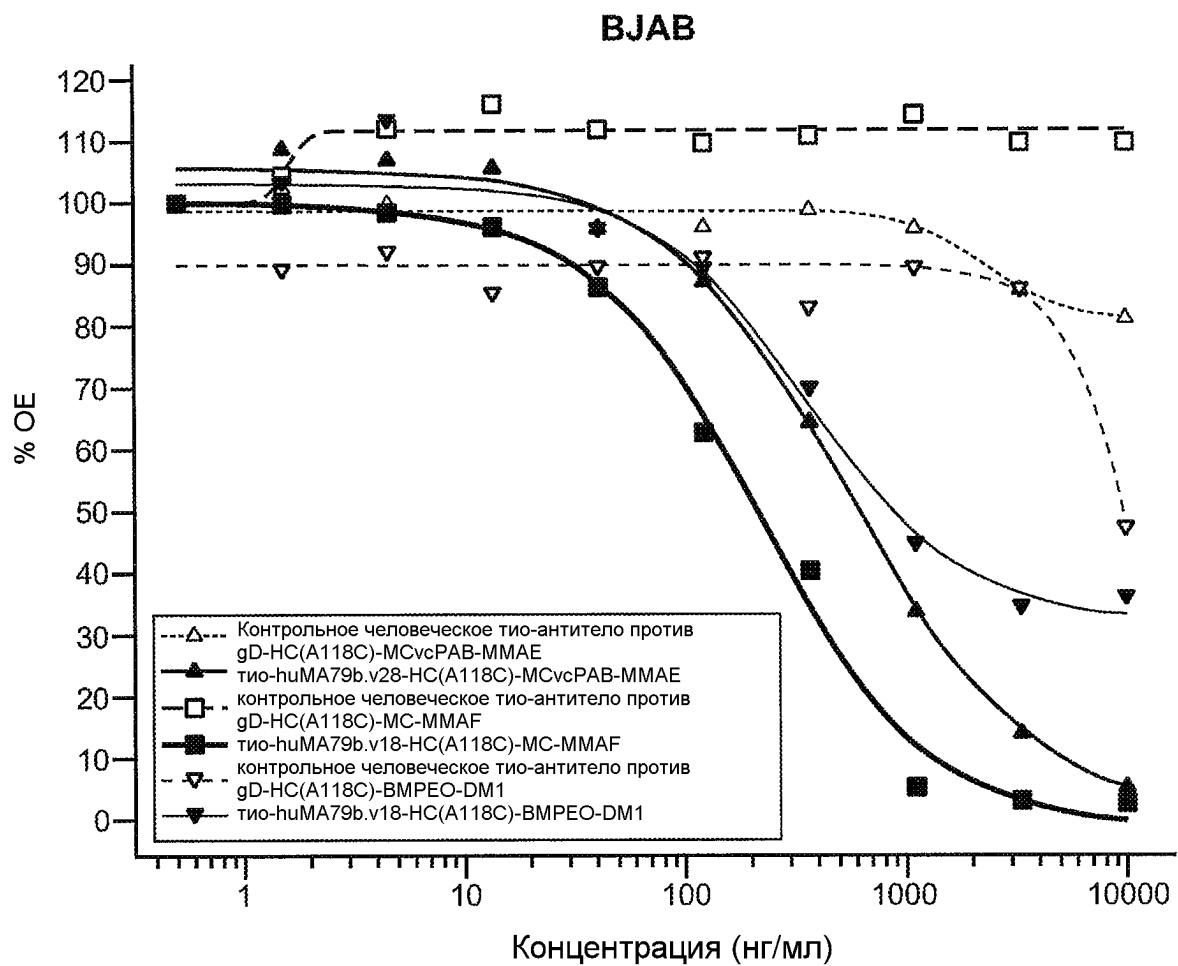
Фиг. 38В



Фиг. 39

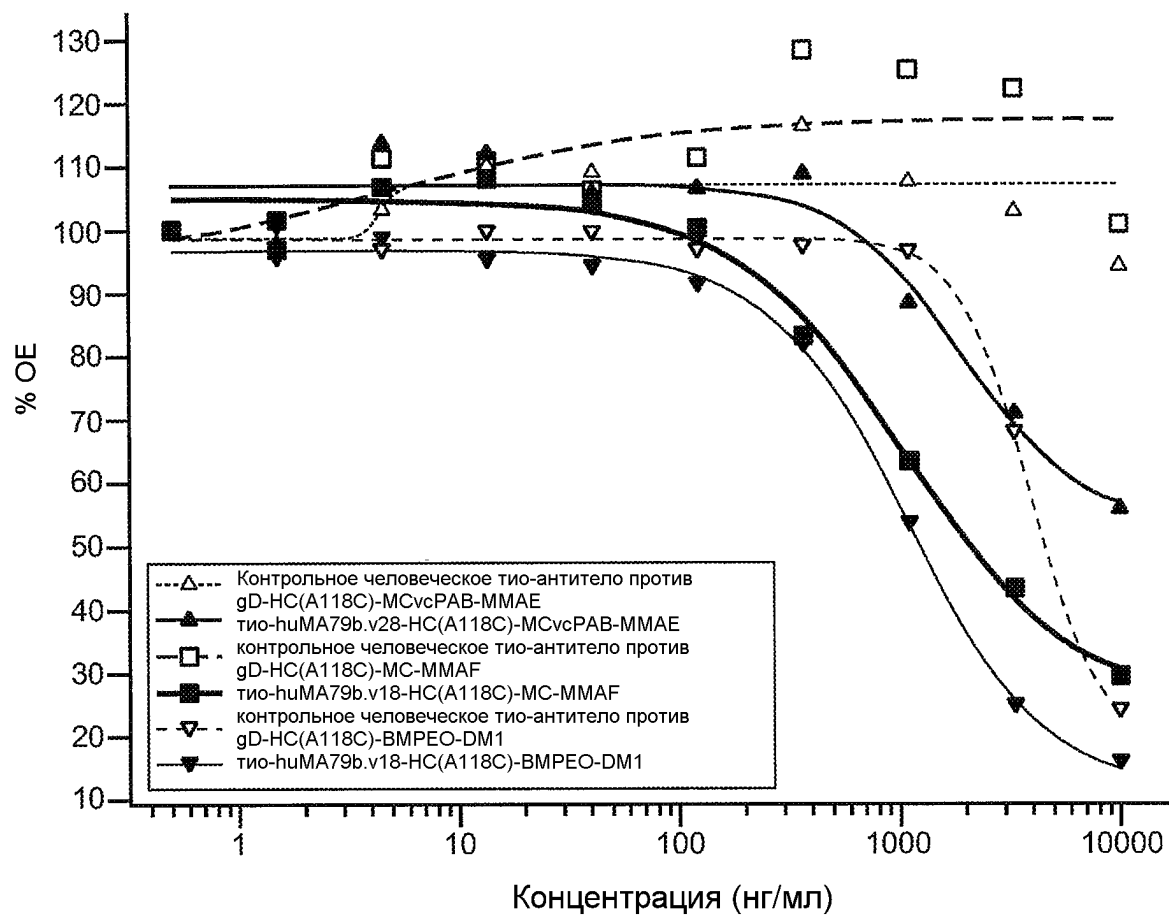


Фиг. 40



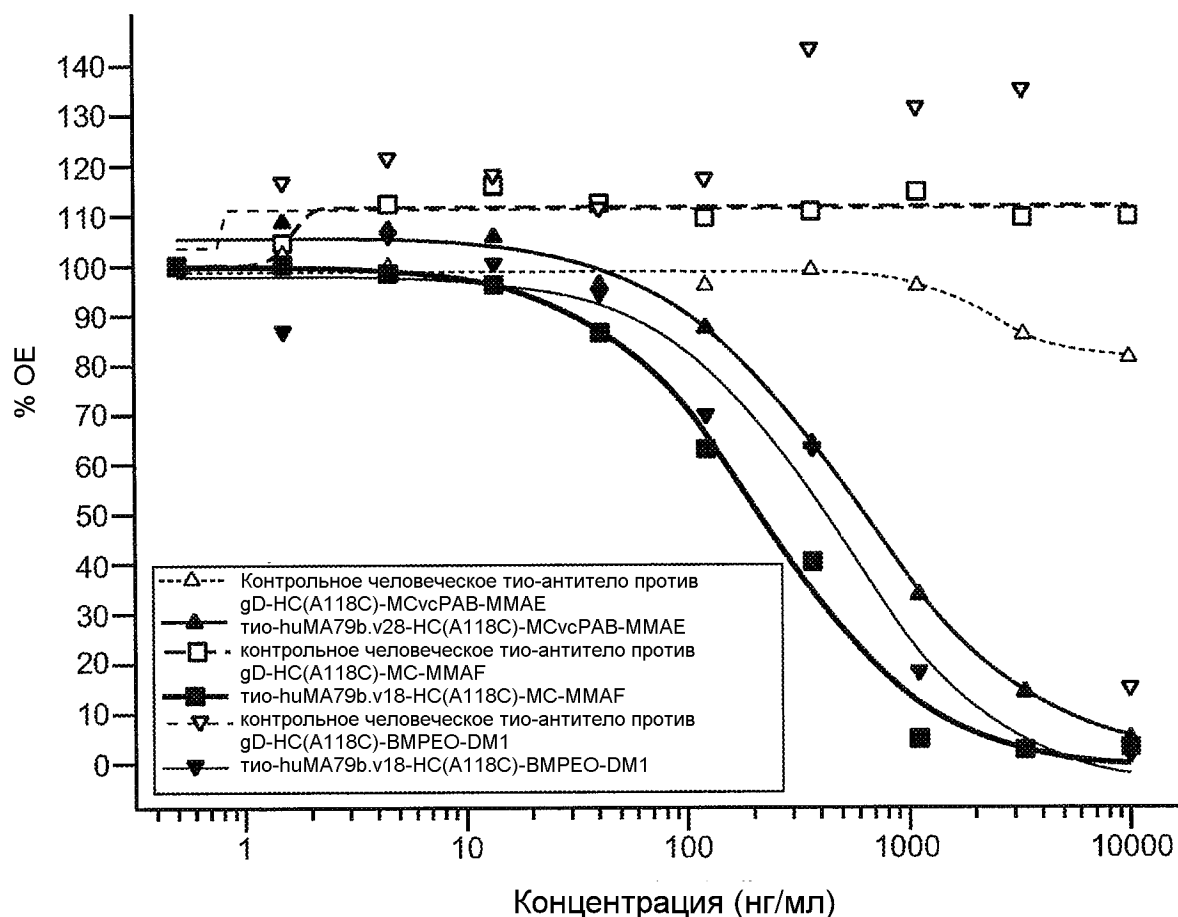
Фиг. 41А

Granta-519



Фиг. 41В

WSU-DLCL2



Фиг. 41С

<p1.cynoCD79b

TCATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGG
 CTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAT
 TGCCCTTGCGGACAGAGCAGTGACCAATGCGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGTGTCCAGCCACTGGC
 TGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCAGCTGAGCCAGTGCCAGCAGCCAAATCAGAGGACCTG
 TACCCGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTCTCGGATCTGGCAGAGCCCACGTTTCATAGCCAGGAA
 ACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACGTGACCAACAGCACCTTCAGCATCGTGAGCTGGC
 TCCGGAAGCGGGAGACGGACAAGGAGCCCCAACAGGTGAACCTGGAGCAGGGCCACATGCATCAG
 ACCCAAACAGCTCTGTCAACACCTTCATCATCCAAGACATCCGGTTTGAGGACAACGGCATCTA
 CTTCTGTGTCAGCAGGAGTGACGAAGACCTCGGAGGTCTACCGGGGCTGCGGCACGGAGCTGCGAG
 TCATGGGGTTTCAGCACCTTGGCACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGCATCATCATG
 ATCCAGACGCTGCTGATCATCTCTTCATCATCGTGCCCATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGA
 CAGCAAGGCCCGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACGGCCACCT
 ACGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTGGGTGAGCACCCAGGTCAG
 GAGTGAAGAGCCAGGACCTCCCCACGGCCTGGGTGCAGGCTCCCCAGCC

Фиг. 42

**<p1.cynoCD79b
DNA548455**

MARLALSPVSSHVLVALLLLLSAAEPVPAAKSEDLYPNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCVVTNSTFSIVSWLRKRETDKEPQQVNLEQGHMHQTQNSSVTTLIIQDIRFEDNGIY
FCQQECSTSEVYRGCSTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLL
DKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Сигнальная последовательность

Аминокислоты 1-26

Трансмембранный домен

Аминокислоты 161-181

Домен иммуноглобулина

Аминокислоты 59-126

Мотив активации иммунорецептора на основе тирозина

Аминокислоты 195-215

Домен V-набора иммуноглобулинов

Аминокислоты 44-145

Сайт N-гликозилирования

Аминокислоты 70-73, 103-106

Сайт фосфорилирования cAMP- и cGMP-зависимой протеинкиназы

Аминокислоты 81-84

Сайт фосфорилирования протеинкиназы C

Аминокислоты 50-52, 61-63, 84-86, 158-160, 214-216

Сайт фосфорилирования казеинкиназы II

Аминокислоты 22-25, 84-87, 158-161, 208-211, 223-226

Сайт фосфорилирования тирозинкиназы

Аминокислоты 115-122

Сайт N-миристоилирования

Аминокислоты 41-46, 120-125

Фиг. 43

Легкая цепь химерного антитела (ch10D10) против CD79b собакоподобных обезьян

ACCTCGGTTC	TATCGATTGA	ATTCCACCAT	GGGATGGTCA	TGTATCATCC	TTTTTCTAGT
AGCAACTGCA	ACTGGAGTAC	ATTCCAGATAT	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	AGTGTACACAG	AGCAGGACAG
CAAGGACAGC	ACCTACAGCC	TCAGCAGCAC	CCTGACGCTG	AGCAAAGCAG	ACTACGAGAA
ACACAAAGTC	TACGCCTGCG	AAGTCACCCA	TCAGGGCCTG	AGCTCGCCCC	TCACAAAGAG
CTTCAACAGG	GGAGAGTGTT	AAGCTTGGCC	GCCATGGCCC	AACTTGTTTA	TTGCAGCTTA
TAATGGTTAC	AAATAAAGCA				

Фиг. 44

Легкая цепь химерного антитела (ch10D10) против CD79b собакоподобных обезьян

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
 FSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQOSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALOSGNSOESVTEODSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 45**Тяжелая цепь химерного антитела (ch10D10) против CD79b собакоподобных обезьян**

CACCTCGGTT CTATCGATTG AATTCCACCA TGGGATGGTC ATGTATCATC CTTTTTCTAG
 TAGCAACTGC AACTGGAGTA CATTCAGAAG TTCAGCTGCA GGAGTCGGGA CCTGGCCTGG
 TGAAACCTTC TCAGTCTCTG TCCCTCACCT GCACTGTCAC 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 CTCCTCCAAG AGCACCTCTG
 GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT
 CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT
 CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CTGTGCCCTC TAGCAGCTTG GGCACCCAGA
 CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC
 CCAAATCTTG TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG
 GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC
 CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT
 GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTCCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA
 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
 CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAAG
 AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA
 TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCC
 TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
 GGCAGCAGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA
 CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AAATGAGTGCG ACGGCCCTAG AGTCGACCTG
 CAGAAGCTTG GCCGCCATGG CCCAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA

Фиг. 46**Тяжелая цепь химерного антитела (ch10D10) против CD79b собакоподобных обезьян**

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
 SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Фиг. 47

Тяжелая цепь сконструированного на основе цистеина анти-супоCD79b ch10D10 A118C тио-MAb**A. Последовательность легкой цепи
тио-анти-супоCD79b (ch10D10)-HC-A118C антитела (LC)**

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHHQOKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQOSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 245)

**B. Последовательность тяжелой цепи
тио-анти-супоCD79b (ch10D10)-HC-A118C антитела (HC)**

DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 244)

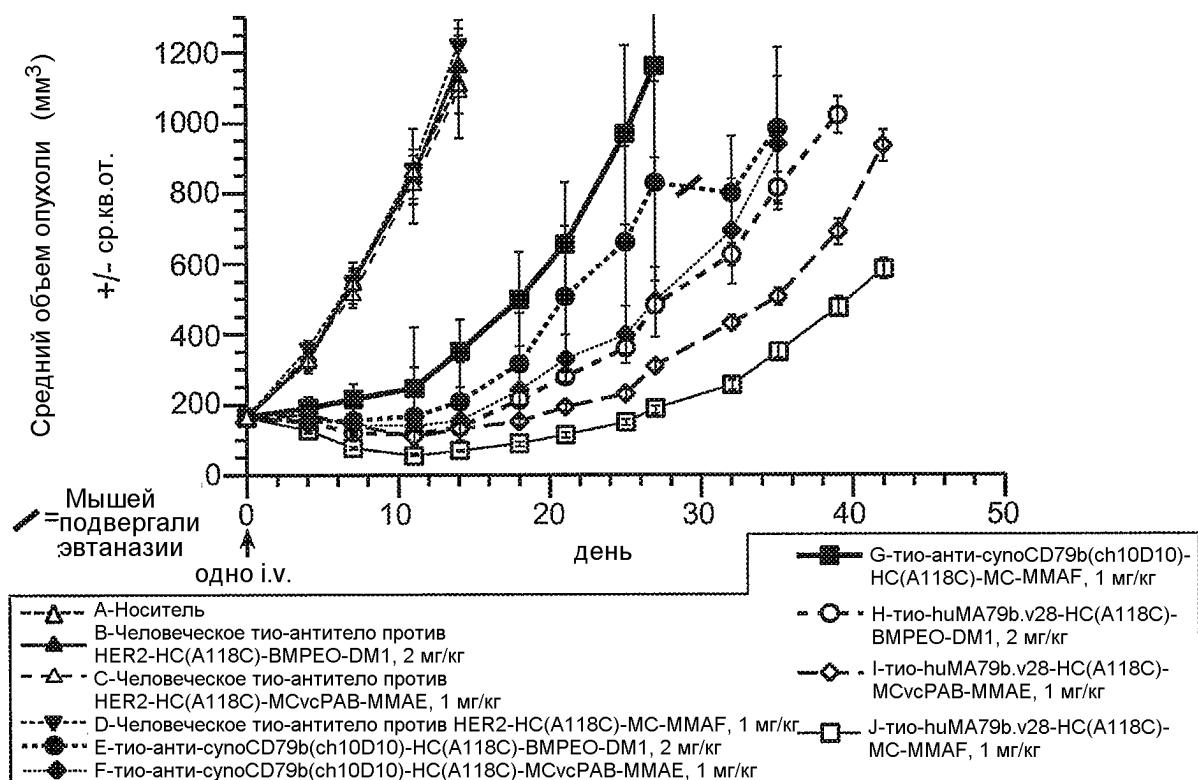
Фиг. 48**Легкая цепь сконструированного на основе цистеина анти-супоCD79b ch10D10 V205C тио-MAb****A. Последовательность легкой цепи
тио-анти-супоCD79b (ch10D10)-HC-V205C антитела (LC)**

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHHQOKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQOSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHOGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 300)

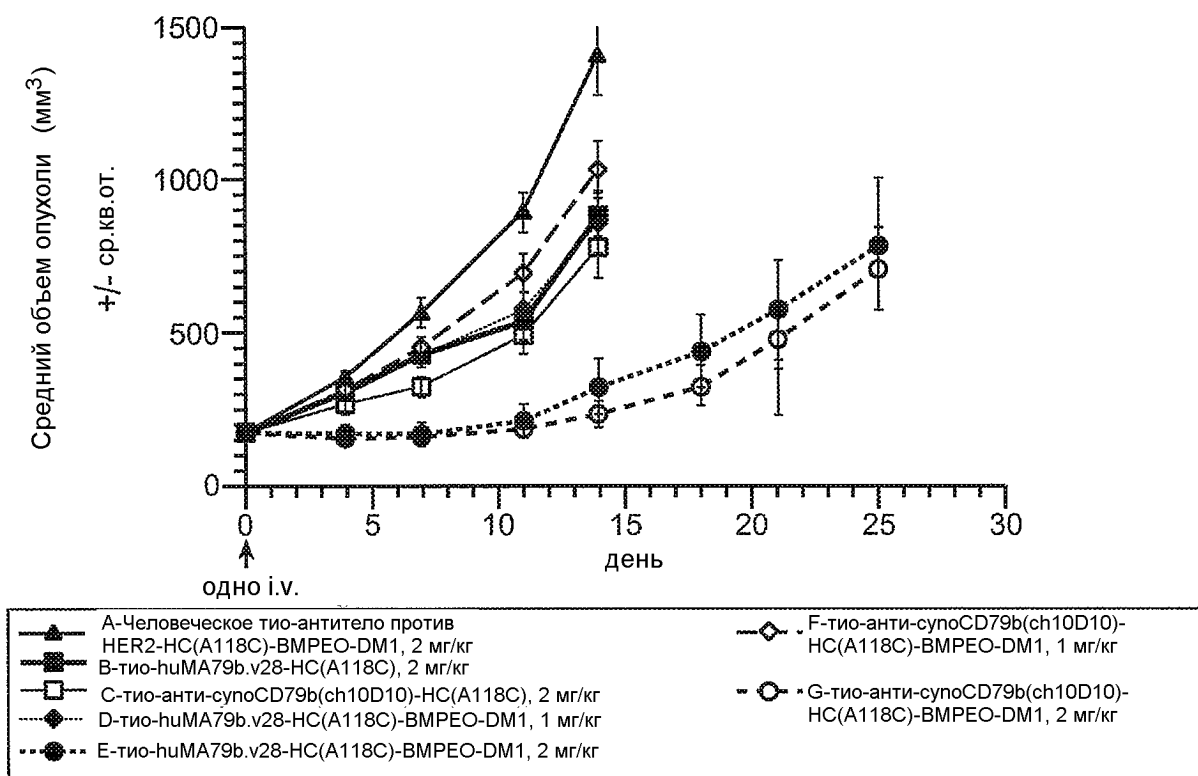
**B. Последовательность тяжелой цепи
тио-анти-супоCD79b (ch10D10)-HC-V205C антитела (HC)**

DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 299)

Фиг. 49



Фиг. 50



Фиг. 51