



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2474557 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.01.05
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.08.20
(86)	Europeisk søknadsnr	12153150.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.07.15
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.07.11
(30)	Prioritet	2007.07.16, US, 950052 P 2008.01.31, US, 25137 P 2008.02.29, US, 32790 P 2008.05.20, US, 54709 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(62)	Avdelt fra	EP2176296, med inndato 2008.07.15
(73)	Innehaver	Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, US-USA
(72)	Oppfinner	Chen, Yvonne, 222 8th Avenue 320, San Mateo, CA 94401, US-USA Dennis, Mark, 120 Plymouth Avenue, San Carlos, CA 94070, US-USA Dornan, David, 1058 Shoreline Drive, San Mateo, CA 94404, US-USA Elkins, Kristi, 524 Maple Avenue, South San Francisco, CA 94080-2994, US-USA Junutula, Jagath Reddy, 34391 Tupelo Street, Fremont, CA 94555, US-USA Polson, Andrew, 281 Berkeley Way, San Francisco, CA 94115, US-USA Zheng, Bing, 156 Montelena Court, Mountain View, CA 94040, US-USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Anti-CD79b-antistoffer og -immunkonjugater og fremgangsmåter for anvendelse
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-01/31065 WO-A1-2009/099728 OKAZAKI M ET AL: "Three new monoclonal antibodies that define a unique antigen associated with prolymphocytic leukemia/non-Hodgkin's lymphoma and are effectively internalized after binding to the cell surface antigen.", 1 January 1993 (1993-01-01), BLOOD 1 JAN 1993, VOL. 81, NR. 1, PAGE(S) 84 - 94, XP002503759, ISSN: 0006-4971 * the whole document *

Anti-CD79b-antistoffer og -immunkonjugater og fremgangsmåter for anvendelse

Beskrivelse

5 OPPFINNELSENS OMRÅDE

Den foreliggende oppfinnelse angår stoffsammensetninger som er nyttige for behandling av hematopoietisk tumor hos pattedyr, og anvendelse av disse stoffsammensetninger til det samme.

10 OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Ondartede tumorer (kreft) er den nest vanligste dødsårsaken i USA etter hjertesykdom (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993)). Kreft er karakterisert ved økning i antallet unormale, eller neoplastiske, celler avledet av et normalt vev som prolifererer og danner en tumormasse, disse neoplastiske tumorcellenes invasjon av tilstøtende vev og dannelse av ondartede celler som til slutt sprer seg via blodet eller lymfesystemet til regionale lymfeknuter og til fjerne steder via en prosess som kalles metastase. I en krefttilstand prolifererer en celle under forhold hvor normale celler ikke ville vokst. Kreft manifesterer seg i en rekke former karakterisert ved forskjellige grader av invasivitet og aggressivitet.

Krefttyper som involverer celler dannet under hematopoiese, en prosess hvor celleelementer av blod, slik som lymfocytter, leukocytter, blodplater, erytrocytter og naturlige drapsceller, dannes og betegnes hematopoietisk kreft. Lymfocytter som kan finnes i blod og lymfevev, og som er viktige for immunresponsen, kategoriseres i to hovedklasser av lymfocytter: B-lymfocytter (B-celler) og T-lymfocytter (T-celler), som medierer henholdsvis humoral og cellemediert immunitet.

30

B-celler modnes i benmargen og forlater margen med et antigenbindende antistoff uttrykt på sin celleoverflate. Når en naiv B-celle først møter antigenet hvorfor dens membranbundne antistoff er spesifikt, begynner cellen å dele seg

raskt, og dens avkom differensierer seg i hukommelses-B-celler og effektorceller kalt "plasmaceller". Hukommelses-B-celler har lengre levetid og fortsetter å uttrykke membranbundet antistoff med samme spesifisitet som den opprinnelige morcellen. Plasmaceller produserer ikke membranbundet antistoff, men
5 produserer i stedet antistoffet i en form som kan utskilles. Utskilte antistoffer er det viktigste effektormolekylet for humoral immunitet.

T-celler modnes i thymus, hvilket stiller til rådighet et miljø for proliferasjon og differensiering av umodne T-celler. Under T-cellemodning gjennomgår T-cellene
10 de genrearrangeringer som produserer T-cellereseptoren og den positive og negative seleksjon som bidrar til å bestemme den modne T-cellens celleoverflatefenotype. Karakteristiske celleoverflatemarkører for modne T-celler er CD3:T-cellereseptorkomplekset og én av koreseptorene, CD4 eller CD8.

15 I forsøk på å oppdage virkningsfulle cellulære mål for kreftbehandling har forskere ønsket å identifisere transmembrane eller på annen måte membranassosierte polypeptider som er spesifikt uttrykt på overflaten av én eller flere særlige typer av kreftceller sammenlignet med på én eller flere normale ikke-kreftceller. Slike membranassosierte polypeptider er ofte mer
20 rikelig uttrykt på overflaten av kreftcellene enn på overflaten av ikke-kreftcellene. Identifiseringen av slike tumorassosierte antigenpolypeptider på celleoverflaten har gitt mulighet til spesifikt å utpeke kreftceller for destruksjon via antistoffbaserte behandlinger. Det anføres i denne sammenheng at antistoffbasert behandling er påvist å være svært virkningsfull ved behandling av
25 visse krefttyper. HERCEPTIN® og RITUXAN® (begge fra Genentech Inc., South San Francisco, California) er for eksempel antistoffer som er anvendt med hell til å behandle henholdsvis brystkreft og non-Hodgkins-lymfom. HERCEPTIN® er nærmere bestemt et rekombinant DNA-avledet humanisert monoklonalt antistoff som selektivt binder til det ekstracellulære domenet av det humane epidermale
30 proto-onkogenet for vekstfaktorreseptor 2 (HER2). HER2-proteinoverekspresjon er observert i 25–30 % av primære brystkrefttyper. RITUXAN® er et genetisk konstruert kimært murint/humant monoklonalt antistoff rettet mot CD20-antigenet funnet på overflaten av normale og ondartede B-lymfocytter. Begge disse antistoffene er rekombinant produsert i CHO-celler.

I andre forsøk på å oppdage virkningsfulle cellemål for kreftbehandling har forskere forsøkt å identifisere 1) ikke-membranassosierte polypeptider som er spesifikt produsert av én eller flere særlige typer av kreftceller sammenlignet med av én eller flere særlige typer av normale ikke-kreftceller, 2) polypeptider som er produsert av kreftceller ved et ekspresjonsnivå som er vesentlig høyere enn for én eller flere normale ikke-kreftceller, eller 3) polypeptider hvor ekspresjonen er spesifikt begrenset til bare én enkelt (eller et svært begrenset antall av forskjellige) vevstyper i både kreft- og ikke-krefttilstand (f.eks. normalt prostata- og prostatatumorvev). Slike polypeptider kan forbli intracellulært plassert eller kan utskilles av kreftcellen. Slike polypeptider kan videre uttrykkes ikke av selve kreftcellen, men i stedet av celler som produserer og/eller utskiller polypeptider med en potensiell eller vekstfremmende virkning på kreftceller. Slike utskilte polypeptider er ofte proteiner som gir kreftceller en vekstfordel fremfor normale celler og omfatter slikt som for eksempel angiogene faktorer, celleadhesjonsfaktorer, vekstfaktorer og lignende. Identifisering av antagonister for slike ikke-membranassosierte polypeptider ville forventes å fungere som virkningsfulle terapeutiske stoffer for behandling av slike krefttyper. Identifisering av ekspresjonsmønsteret for slike polypeptider ville videre være nyttig for diagnostisering av særlige krefttyper hos pattedyr.

Tross de ovennevnte fremskrittene i kreftbehandlingen av pattedyr er det et stort behov for ytterligere terapeutiske stoffer som kan oppdage henholdsvis forekomst av tumor hos et pattedyr og virkningsfullt inhibere neoplastisk cellevekst. Det er følgelig en gjenstand for den foreliggende oppfinnelse å identifisere polypeptider, cellemembranassosierte, utskilte eller intracellulære polypeptider hvor ekspresjonen er spesifikt begrenset til bare én enkelt (eller et svært begrenset antall av forskjellige) vevstyper, hematopoietisk vev, i både kreft- og ikke-krefttilstand, og anvende disse polypeptidene, og deres kodende nukleinsyrer, til å produsere stoffsammensetninger som er nyttige for terapeutisk behandling og/eller påvisning av hematopoietisk kreft hos pattedyr.

CD79 er signalkomponenten i B-cellerreseptoren bestående av en kovalent heterodimer inneholdende CD79a (Ig α , mb-1) og CD79b (Ig β , B29). CD79a og CD79b inneholder i hvert tilfelle et ekstracellulært immunoglobulin (Ig)-domene, et transmembrant domene og et intracellulært signaldomene, et ITAM-domene (ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif). CD79 er uttrykt på B-

celler og i non-Hodgkins-lymfomceller (NHL) (Cabezudo et al., *Haematologica*, 84:413–418 (1999); D'Arena et al., *Am. J. Hematol.*, 64: 275–281 (2000); Olejniczak et al., *Immunol. Invest.*, 35: 93–114 (2006)). Både CD79a, CD79b og sIg er nødvendige for overflateekspresjon av CD79 (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3): 270–7)). Den gjennomsnittlige overflateekspresjonen av CD79b på NHL-er er lik den på normale B-celler, men med en større rekkevidde (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3): 270–7 (2001)).

I og med CD79b-ekspresjonen er det gunstig å produsere terapeutiske antistoffer mot CD79b-antigenet som gir minst mulig eller ingen antigenisitet når de tilføres til pasienter, spesielt for kronisk behandling. Den foreliggende oppfinnelse fyller dette og andre behov. Den foreliggende oppfinnelse stiller til rådighet anti-CD79b-antistoffer som overvinner begrensningene i nåværende terapeutiske sammensetninger og gir ytterligere fordeler som vil være åpenbare på grunnlag av den detaljerte beskrivelsen nedenfor. Anti-CD79b-antistoffer er beskrevet i Okazaki et al (1993), *Blood* 81(1), s. 84–94.

Anvendelsen av antistofflegemiddelkonjugater (ADC), dvs. immunkonjugater, til lokal tilførsel av cytotoksiske eller cytostatiske stoffer, dvs. legemidler for drap eller inhibering av tumorceller ved behandling av kreft (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543–549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9): 1137–1146; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207–212; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605–614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151–172; US 4975278) gir mulighet for målrettet tilførsel av legemiddelenheten til tumorer, og intracellulær akkumulering deri, hvor systemisk tilførsel av disse ukonjugerte legemiddelstoffene kan resultere i uakseptable nivåer av toksisitet for normal celler og de tumorcellene som ønskes eliminert (Baldwin et al (1986) *Lancet* s. (Mar. 15, 1986):603–05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al (ed.s), s. 475–506). Forsøk på å forbedre den terapeutiske indeksen, dvs. største virkning og minste toksisitet av ADC, har fokusert på selektiviteten for polyklonale (Rowland et al (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183–87) og monoklonale antistoffer (mAbs) i tillegg til legemiddelbindende og legemiddelfrisettende egenskaper (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543–549). Legemiddelenheter som anvendes i

antistofflegemiddelkonjugater, omfatter bakterieproteintoksiner slik som difteritoksin, planteproteintoksiner slik som ricinus, små molekyler slik som auristatiner, geldanamycin (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), maytansinoider (EP 1391213; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618–8623), kalicheamicin (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336–3342), daunomycin, doksorubicin, metotreksat og vindesin (Rowland et al (1986) *ovenfor*). Legemiddelenhetene kan påvirke cytotoksiske og cytostatiske mekanismer omfattende tubulinbinding, DNA-binding eller topoisomeraseinhibering. Noen cytotoksiske legemidler har en tendens til å være inaktive eller mindre aktive når de blir konjugert til større antistoffer eller proteinreseptorligander.

Auristatinpeptidene, auristatin E (AE) og monometylauristatin (MMAE), syntetiske analoger til dolastatin (WO 02/088172), er konjugert som legemiddelenheter til: i) kimære monoklonale antistoffer cBR96 (spesifikke for Lewis Y på karsinomer), ii) cAC10, hvilket er spesifikt for CD30 på hematologiske ondartetheter (Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765–773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778–784; Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458–1465; US 2004/0018194, iii) anti-CD20-antistoffer slik som rituksan (WO 04/032828) for behandling av CD20-uttrykkende krefttyper og immunforstyrrelser, iv) anti-EphB2R-antistoff 2H9 for behandling av kolorektalkreft (Mao et al (2004) Cancer Research 64(3):781–788), v) antistoffet E-selektin (Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63:6387–6394), vi) trastuzumab (HERCEPTIN®, US 2005/0238649) og vi) anti-CD30-antistoffer (WO 03/043583). Varianter av auristatin E er beskrevet i US 5767237 og US 6124431. Monometylauristatin E konjugert til monoklonale antistoffer er beskrevet i Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, fremlagt 28. mars 2004. Auristatinanalogene MMAE og MMAF er konjugert til forskjellige antistoffer (US 2005/0238649).

Klassiske midler for binding, dvs. binding gjennom kovalente bindinger, av en legemiddelenhet til et antistoff fører vanligvis til en heterogen blanding av molekyler hvor legemiddelenhetene bindes til en rekke steder på antistoffet.

Cytotoksiske legemidler er for eksempel vanligvis konjugert til antistoffer gjennom de ofte tallrike lysinenhetene av et antistoff, hvilket danner en heterogen blanding av antistofflegemiddelkonjugat. Avhengig av reaksjonsbetingelsene inneholder den heterogene blandingen typisk en fordeling

5 av antistoffer med fra 0 til minst ca. 8 bundne legemiddelenheter. I hver undergruppe av konjugater med et særlig heltallsforhold mellom legemiddelenheter og antistoff er det i tillegg en potensielt heterogen blanding hvor legemiddelenheten er bundet på forskjellige steder på antistoffet. Analytiske og forberedende fremgangsmåter kan være utilstrekkelige til å

10 separere og karakterisere antistofflegemiddelkonjugatets artsmolekyler i den heterogene blandingen fra en konjugeringsreaksjon. Antistoffer er store, komplekse og strukturelt mangfoldige biomolekyler, ofte med mange reaktive funksjonsgrupper. Deres reaktivitet med linkerreagenser og legemiddellinkermellomprodukter er avhengig av faktorer slik som pH,

15 konsentrasjon, saltkonsentrasjon og hjelpeløsemidler. Den flertrinns konjugeringsprosessen kan videre være ikke-reproduserbar på grunn av vanskeligheter ved regulering av reaksjonsbetingelsene og karakterisering av reaktanter og mellomprodukter.

20 Cysteintioler er reaktive ved nøytral pH, i motsetning til de fleste aminer som protoneres og er mindre nukleofile i nærheten av pH 7. Siden frie tiolgrupper (RSH, sulfhydryl) er relativt reaktive, finnes ofte proteiner med cysteinenheter i deres oksiderte form som disulfidbundne oligomerer eller har internt broede disulfidgrupper. Ekstracellulære proteiner har vanligvis ikke frie tioler (Garman,

25 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, s. 55). Antistoffcysteintiolgrupper er alminneligvis mer reaktive, dvs. mer nukleofile, overfor elektrofile konjugeringsreagenser enn antistoffamin- eller hydroksylgrupper. Cysteinenheter er tilført til proteiner ved genkonstruksjonsmetoder for dannelsen av kovalente bindinger til ligander eller

30 for dannelsen av nye intramolekulære disulfidbindinger (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

35 98(15):8480–8484; US 6248564). Konstruksjon i cysteintiolgrupper ved mutasjon av forskjellige aminosyreenheter av et protein til cysteinaminosyrer er

imidlertid potensielt problematisk, særlig ved uparede enheter (frie Cys-enheter) eller dem som er relativt tilgjengelige for reaksjon eller oksidering. I konsentrerte løsninger av proteinet, enten det er i periplasmaet av *E. coli*, kultursupernatanter eller delvis eller fullstendig rensset protein, kan uparede Cys-

5 enheter på overflaten av proteinet pares og oksidere for dannelse av intermolekylære disulfider, og således proteindimerer eller -multimerer. Disulfiddimerdannelse gjør den nye Cys-enheten ureaktiv for konjugering til et legemiddel, en ligand eller en annen markør. Hvis proteinet oksidativt danner en intramolykelær disulfidbinding mellom den nylig konstruerte Cys-enheten og en

10 eksisterende Cys-enhet, er begge Cys-tiolgruppene videre utilgjengelige for deltagelse og vekselvirkninger på det aktive stedet. Proteinene kan videre gjøres inaktivt eller ikke-spesifikt ved misfolding eller tap av tertiærstruktur (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1–9).

15 Cysteinkonstruerte antistoffer er konstruert som FAB-antistofffragmenter (tioFab) og uttrykt som monoklonale IgG-antistoffer av full lengde (tioMab) (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41–52; US 2007/0092940, hvortil det henvises, og som i sin helhet anses som opptatt heri). TioFab- og tioMab-antistoffer er konjugert gjennom linkere ved de nylig tilførte cysteintiolene med

20 tiolreaktive linkerreagenser og legemiddellinkerreagenser for fremstilling av antistofflegemiddelkonjugater (tio-ADC).

Fremgangsmåter for humanisering av ikke-humane antistoffer hos pattedyr er beskrevet i WO01/31065.

25 **KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN**

Oppfinnelsen stiller til rådighet anti-CD79b-antistoffer eller funksjonelle fragmenter derav, og deres anvendelse til behandling av hematopoietiske tumorer.

30

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff som binder, fortrinnsvis spesifikt, til et hvilket som helst av polypeptidene beskrevet oven- eller nedenfor. Antistoffet er eventuelt et monoklonalt antistoff, et antistofffragment, herunder et Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragment, et diastoff, et antistoff med ett

35 domene, et kimært antistoff, et humanisert antistoff, et enkjedet antistoff eller

et antistoff som kompetitivt inhiberer bindingen av et anti-CD79b-polypeptidantistoff til dets respektive antigene epitop. Antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelse kan eventuelt konjugeres til et vekstinhiberende stoff eller cytotoksisk stoff, slik som et toksin, herunder for eksempel et auristatin, et
 5 maytansinoid, et dolostatinderivat eller en kalicheamicin, et antibiotikum, en radioaktiv isotop, et nukleolytisk enzym eller lignende. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan eventuelt produseres i CHO-celler eller bakterieceller og fortrinnsvis indusere døden for en celle hvortil de binder. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan i sammenheng med
 10 påvisning være påvisbart merket, bundet til en fast fase eller lignende.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet (f.eks. antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b) i monovalent eller bivalent form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet
 15 som et IgG-fragment for CD79b) i det vesentlige er lik eller større enn affiniteten i henholdsvis monovalent eller bivalent form til et murint antistoff (f.eks. det murine antistoffets affinitet som et Fab-fragment eller som et IgG-fragment for CD79b) eller et kimært antistoff (f.eks. det kimære antistoffets affinitet som et Fab-fragment eller som et IgG-fragment for CD79b), omfattende, bestående av
 20 eller i det vesentlige bestående av en sekvens i en lett og en tung kjedes variable domene som angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14).

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-
 25 antistoff hvor antistoffets affinitet i bivalent form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er 0,4 nM, 0,2 nM eller 0,5 nM.

Beskrevet heri er et antistoff som binder til CD79b, hvor antistoffet omfatter minst én, to, tre, fire, fem eller seks HVR-er valgt fra gruppen bestående av:

- 30 i) HVR-L1 omfattende sekvens A1–A15, hvor A1–A15 er KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)
- ii) HVR-L2 omfattende sekvens B1–B7, hvor B1–B7 er AASNLES (SEQ ID NO: 132)

- iii) HVR-L3 omfattende sekvens C1–C9, hvor C1–C9 er QQSNEEDPLT (SEQ ID NO: 133)
 - iv) HVR-H1 omfattende sekvens D1–D10, hvor D1–D10 er GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)
 - 5 v) HVR-H2 omfattende sekvens E1–E18, hvor E1–E18 er GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) og
 - vi) HVR-H3 omfattende sekvens F1–F10, hvor F1–F10 er TRRVVPVYFDY (SEQ ID NO: 136),
- 10 et antistoff som binder til CD79b, hvor antistoffet omfatter minst én HVR-variant, hvor HVR-sekvensvarianten omfatter modifikasjon av minst én enhet av sekvensen angitt i SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 eller 136,
- et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC,
 - 15 HVR2-HC og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 164–166),
- et antistoff omfattende en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC, HVR2-LC og/eller HVR3-LC-sekvens angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 156–158),
 - 20 et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC, HVR2-HC og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 183–185),
- 25 et antistoff omfattende en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC, HVR2-LC og/eller HVR3-LC-sekvens angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 175–177),
- et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC, HVR2-HC og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 202–
 - 30 204),
- et antistoff omfattende en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC, HVR2-LC og/eller HVR3-LC-sekvens angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 194–196),

et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC, HVR2-HC og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 221–223), og

5

et antistoff omfattende en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC, HVR2-LC og/eller HVR3-LC-sekvens angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 213–215).

10 I et aspekt omfatter oppfinnelsen et anti-CD79b-antistoff omfattende den tunge kjedens variable domene med SEQ ID NO: 208 og den lette kjedens variable domene med SEQ ID NO: 207.

I et annet aspekt stiller den foreliggende oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff omfattende en tung kjedes variable domene som har minst 90 % aminosyresekvensidentitet til aminosyresekvensen av SEQ ID NO:208, og
 15 en lett kjedes variable domene som har minst 90 % aminosyresekvensidentitet til aminosyresekvensen av SEQ ID NO:207, hvor antistoffets affinitet, i sin bivalente form, til humant CD79b er i det vesentlige den samme som eller minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 ganger større enn affiniteten til et murint eller kimerisk antistoff omfattende en lett kjedes og en tung kjedes variable sekvens
 20 av SEQ ID NO: 10 og SEQ ID NO: 14 i sin bivalente form, hvor bindingsaffiniteten uttrykkes som en K_d-verdi, og hvor bindingsaffiniteten måles ved Biacore.

I et annet aspekt stiller den foreliggende oppfinnelsen til rådighet et humanisert
 25 anti-CD79b-antistoff omfattende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3:

hvor HVR-L1 omfatter en HVR-L1-variant der posisjon A9 i sekvens A1-A15 er blitt modifisert til E, hvor A1-A15 er KASQSVDYDGDSFLN;

hvor HVR-H3 omfatter en HVR-H3-variant der posisjon F6 i sekvens F1-F10 er
 30 blitt modifisert til I, posisjon F7 er blitt modifisert til R og posisjon F8 er blitt modifisert til L, hvor F1-F10 er TRRVVPVYFDY; og

hvor tre eller fire av HVR-L2, HVR-L3, HVRH1 og HVR-H2 er valgt fra gruppen bestående av:

(i) HVR-L2 omfattende sekvens B1-B7, hvor B1-B7 er AASNLES;

35 (ii) HVR-L3 omfattende sekvens C1-C9, hvor C1-C9 er QQSNEPLT;

(iii) HVR-H1 omfattende sekvens D1-D10, hvor D1-D10 er GYTFSSYWIE; og

(iv) HVR-H2 omfattende sekvens E1-E18, hvor E1-E18 er
GEILPGGGDTNYNEIFKG;

5 hvor antistoffets affinitet, i sin bivalente form, til humant CD79b er i det
vesentlige den samme som eller minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 ganger
større enn affiniteten til et murint eller kimerisk antistoff omfattende en lett
kjedes og tung kjedes variable sekvens av SEQ ID NO: 10 og SEQ ID NO: 14 i
sin bivalente form, hvor bindingsaffiniteten uttrykkes som en Kd-verdi, og hvor
bindingsaffiniteten måles ved Biacore.

10

Også beskrevet heri er et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff omfattende én
eller flere frie cysteinaminosyrer og en sekvens valgt fra SEQ ID NO: 251-298.
Det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet kan binde til et CD79b-polypeptid.
Det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet kan fremstilles ved en
15 fremgangsmåte omfattende utbytting av én eller flere aminosyreenheter av et
anti-CD79b-morantistoff med cystein.

20

Også beskrevet heri er et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff omfattende én
eller flere frie cysteinaminosyrer hvor det cysteinkonstruerte anti-CD79b-
antistoffet binder til et CD79b-polypeptid og fremstilles ved en fremgangsmåte
omfattende utbytting av én eller flere aminosyreenheter av et anti-CD79b-
morantistoff med cystein hvor morantistoffet omfatter minst én HVR-sekvens
valgt fra:

25

a) HVR-L1 omfattende sekvens A1-A15, hvor A1-A15 er
KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) eller KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID
NO: 137),

b) HVR-L2 omfattende sekvens B1-B7, hvor B1-B7 er AASNLES (SEQ ID NO:
132)

30

c) HVR-L3 omfattende sekvens C1-C9, hvor C1-C9 er QQSNEDPLT (SEQ ID
NO: 133)

d) HVR-H1 omfattende sekvens D1-D10, hvor D1-D10 er GYTFSSYWIE (SEQ
ID NO: 134)

e) HVR-H2 omfattende sekvens E1–E18, hvor E1–E18 er
GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) og

f) HVR-H3 omfattende sekvens F1–F10, hvor F1–F10 er TRRVVYFDY (SEQ
ID NO: 136) eller TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

5

Det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet kan være et monoklonalt antistoff, et antistoffragment, et kimært antistoff, et humanisert antistoff, et enkjedet antistoff eller et antistoff som kompetitivt inhiberer bindingen av et anti-CD79b-polypeptidantistoff til sin respektive antigene epitop. Antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelse kan eventuelt konjugeres til et vekstinhiberende stoff eller cytotoxisk stoff, slik som et toksin, herunder for eksempel et auristatin eller maytansinoid. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan eventuelt produseres i CHO-celler eller bakterieceller og fortrinnsvis inhibere vekst eller proliferasjon av eller indusere døden for en celle hvortil de binder.

10 Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan i sammenheng med diagnostisering være påvisbart merket, bundet til en fast fase eller lignende.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet fremgangsmåter for fremstilling av et antistoff ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen stiller for eksempel til rådighet en fremgangsmåte for fremstilling av et CD79b-antistoff (som definert heri omfatter full lengde og fragmenter derav), idet nevnte fremgangsmåte omfatter ekspresjon i en egnet vertscelle av en rekombinant vektor ifølge oppfinnelsen som koder for nevnt antistoff (eller fragment derav) og utvinner nevnte antistoff.

20 I et aspekt er oppfinnelsen en farmasøytisk formulering omfattende et antistoff ifølge oppfinnelsen eller et antistofflegemiddelkonjugat ifølge oppfinnelsen, og et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, bærestoff eller hjelpestoff.

Også beskrevet heri er en anordning omfattende en beholder, og en sammensetning i beholderen, hvor sammensetningen omfatter ett eller flere CD79b-antistoffer ifølge oppfinnelsen.

Også beskrevet heri er et analysesett omfattende en første beholder omfattende en sammensetning omfattende ett eller flere CD79b-antistoffer ifølge oppfinnelsen, og en andre beholder omfattende en buffer.

35

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet anvendelse av et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til fremstilling av et legemiddel for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av en sykdom, slik som en krefttype, en tumor og/eller en celleproliferativ forstyrrelse.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en in vitro fremgangsmåte for inhibering av veksten av en celle som uttrykker CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket forårsaker en inhibering av veksten av nevnte celle. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff eller immunkonjugat til anvendelse for å inhibere veksten av en tumorcelle som uttrykker CD79b. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff for anvendelse i en fremgangsmåte for terapeutisk behandling av et pattedyr som har en krefttumor omfattende en celle som uttrykker CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter tilførsel til nevnte pattedyr av en terapeutisk virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket virkningsfullt behandler nevnte pattedyr. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling eller forebygging av en celleproliferativ forstyrrelse assosiert med økt CD79b-ekspresjon, idet nevnte fremgangsmåte omfatter tilførsel til en pasient med behov for slik behandling av en virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket virkningsfullt behandler eller forebygger nevnte celleproliferative forstyrrelse. I en utførelsesform er nevnte proliferative forstyrrelse kreft. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en in vitro fremgangsmåte for inhibering av veksten av en celle, hvor vekst av nevnte celle er minst delvis avhengig av en vekstpotensierende virkning av CD79b, idet nevnte

fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og en virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket inhiberer veksten av nevnte celle. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoksisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

5

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff for anvendelse i en fremgangsmåte for terapeutisk behandling av en tumor hos et pattedyr, hvor veksten av nevnte tumor er minst delvis avhengig av en vekstpotensierende virkning av CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og en virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket virkningsfullt behandler nevnte tumor. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoksisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

10

15 I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en farmasøytisk formulering for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av kreft omfattende tilførsel til en pasient av den farmasøytiske formuleringen omfattende et immunkonjugat beskrevet heri, et akseptabelt fortynningsmiddel, bærerstoff eller hjelpestoff.

20 I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en in vitro fremgangsmåte for inhibering av B-celleproliferasjon omfattende eksponering av en celle for et immunkonjugat omfattende et antistoff ifølge oppfinnelsen under betingelser som gir mulighet for binding av immunkonjugatet til CD79b.

25 I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en fremgangsmåte for bestemmelse av forekomsten av CD79b i en prøve som antas å inneholde CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter eksponering av nevnte prøve for et antistoff ifølge oppfinnelsen, og bestemmelse av binding av nevnte antistoff til CD79b i nevnte prøve hvor binding av nevnte antistoff til CD79b i nevnte prøve er indikativ for forekomsten av nevnte protein i nevnte prøve.

30

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en fremgangsmåte for diagnostisering av en celleproliferativ forstyrrelse assosiert med en økning i celler, slik som B-celler, som uttrykker CD79b, idet fremgangsmåten omfatter opprettelse av kontakt mellom testceller i en biologisk prøve og hvilke som helst av ovennevnte antistoffer, bestemmelse av nivået av antistoff bundet til testceller i prøven ved

35

påvisning av binding av antistoffet til CD79b og sammenligning av nivået av antistoff bundet til celler i en kontrollprøve, hvor nivået av bundet antistoff er normalisert etter antallet CD79b-uttrykkende celler i testen og kontrollprøvene, og hvor et høyere nivå av antistoff bundet i testprøven sammenlignet med

5 kontrollprøven angir forekomst av en celleproliferativ forstyrrelse assosiert med celler som uttrykker CD79b.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en fremgangsmåte for påvisning av løselig CD79b i blod eller serum, idet fremgangsmåten omfatter opprettelse av

10 kontakt mellom en testprøve av blod eller serum fra et pattedyr som antas å ha en B-celleproliferativ forstyrrelse, og et anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen, og påvisning av en økning i løselig CD79b i testprøven i forhold til en kontrollprøve av blod eller serum fra et normalt pattedyr.

15 I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en fremgangsmåte for binding av et antistoff ifølge oppfinnelsen til en celle som uttrykker CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og et antistoff ifølge oppfinnelsen. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et

20 vekstinhiberende stoff.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGEN

Figur 1 viser en nukleotidsekvens (SEQ ID NO: 1) for et PRO36249-cDNA, hvor SEQ ID NO: 1 er en klon heri betegnet "DNA225786" (også betegnet "CD79b").

25 Nukleotidsekvensen koder for CD79b med start- og stoppkodonene angitt med understreket, fet skrift.

Figur 2 viser aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 2) avledet av kodingssekvensen av SEQ ID NO: 1 angitt på figur 1.

30

Figur 3 viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 3) i den lette kjeden i kimært murint CD79b-antistoff (chMA79b) IgG1 (MA79b er et murint monoklonalt anti-CD79b-antistoff). Nukleotidsekvensen koder for den lette kjeden i chMA79b med start- og stoppkodonene angitt med understreket, fet skrift.

35

Figur 4 viser aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 4), som mangler den første 18-aminosyresignalsekvensen, avledet av kodingssekvensen av SEQ ID NO: 3 angitt på figur 3. Variable regioner er regioner som ikke er understreket.

- 5 Figur 5 viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 5) i den tunge kjeden i kimært murint antistoff (chMA79b) IgG1 (MA79b er et murint monoklonalt anti-CD79b-antistoff). Nukleotidsekvensen koder for den tunge kjeden i chMA79b med start- og stoppkodonene angitt med understreket, fet skrift.
- 10 Figur 6 viser aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 6), som mangler den første 18-aminosyresignalsekvensen og det siste lysinet (K) før stoppkodonet, avledet av kodingssekvensen av SEQ ID NO: 5 angitt på figur 5. Variable regioner er regioner som ikke er understreket.
- 15 Figur 7A–B viser sammenstillingen av sekvenser i de variable lette kjedene for følgende: den lette kjedens humane kappa I-konsensussekvens (merket som "huKI"; SEQ ID NO: 9) med VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3, VL-FR4 (i hvert tilfelle SEQ ID NO: 139–142), murint anti-CD79b-antistoff (merket som "MA79b", SEQ ID NO: 10), MA79b-podet "humanisert" antistoff (merket som "huMA79b-poding";
20 SEQ ID NO: 11), MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 17 (merket som "huMA79b.v17", SEQ ID NO: 169), MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 18 (merket som "huMA79b.v18", SEQ ID NO: 188), MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 28 (merket som "huMA79b.v28", SEQ ID NO: 207) og MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 32 (merket som "huMA79b.v32", SEQ ID
25 NO: 226). Posisjoner er nummerert ifølge Kabat, og hypervariable regioner (HVR-er) podet fra MA79b til den variable lette kappa I-konsensusstrukturen er innrammet.

- 30 Figur 8A–B viser sammenstillingen av sekvenser i de variable tunge kjedene for følgende: den tunge kjedens humane undergruppe III-konsensussekvens (merket som "humIII", SEQ ID NO: 13) med VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3 og VH-FR4 (SEQ ID NO: 143–146), murint anti-CD79b-antistoff (merket som "MA79b", SEQ ID NO: 14), MA79b-podet "humanisert" antistoff (merket som "huMA79b-poding"; SEQ ID NO: 15) (inneholdende 71A, 73T og 78A), MA79b-podet
35 "humanisert" antistoffvariant 17 (merket som "huMA79b.v17", SEQ ID NO: 170) (inneholdende 71A, 73T og 78A), MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 18

(merket som "huMA79b.v18", SEQ ID NO: 189) (inneholdende 71A, 73T og 78A), MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 28 (merket som "huMA79b.v28", SEQ ID NO: 208) (inneholdende 71A, 73T og 78A) og MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 32 (merket som "huMA79b.v32", SEQ ID NO: 227) (inneholdende 71A, 73T og 78A). Posisjoner er nummerert ifølge Kabat, og hypervariable regioner (HVR-er) podet fra MA79b til den variable tunge undergruppe III-konsensusstrukturen er innrammet.

Figur 9 viser forskjellige HVR-sekvenser i valgte MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter (SEQ ID NO: 17–21) hvor hver variant har en enkelt aminosyreendring i en enkelt HVR i det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet (HVR-L1 (SEQ ID NO: 131), HVR-L2 (SEQ ID NO: 132), HVR-L3 (SEQ ID NO: 133)). Sekvensene i de variable lette og de variable tunge kjedene utenfor de angitte enkle aminosyreendringene var identiske med huMA79b-podingen og er ikke angitt. Ingen endringer ble observert i HVR-H1 (SEQ ID NO: 134), HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) eller HVR-H3 (SEQ ID NO: 136) i det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet.

Figur 10 viser forskjellige HVR-sekvenser i valgte MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter (SEQ ID NO: 22–106), herunder huMA79b L2-2 (heri også betegnet "L2") en huMA79b H3-10 (heri også betegnet "H3") hvor hver variant har flere aminosyreendringer i en enkelt HVR-region i det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet (HVR-L2 (SEQ ID NO: 132), HVR-L3 (SEQ ID NO: 133)). 133), HVR-H1 (SEQ ID NO: 134), del av HVR-H3 (SEQ ID NO: 136) er angitt på figur 10 som SEQ ID NO: 107). Sekvensene i de variable lette og de variable tunge kjedene utenfor de angitte aminosyreendringene var lik huMA79b-podingen og er ikke angitt. Ingen endringer ble observert i HVR-L1 (SEQ ID NO: 131) eller HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) i det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet.

Figur 11 viser Biacore-analyse av valgte anti-CD79b-antistoffer, herunder murint CD79b-antistoff (merket som "MA79b"), MA79b-podet "humanisert" antistoff (merket som "huMA79b-poding") og MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter, herunder 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) og huMA79b L2/H3 (L2-2- og H3-10-mutasjoner

beskrevet nedenfor) til angitte antigener, herunder det ekstracellulære domenet i humant CD79b (huCD79b_{ecd}), det ekstracellulære domenet i humant CD79b som er fusjonert til Fc (huCD79b_{ecd}-Fc) og et 16-aminosyrepeptid inneholdende epitopen for MA79b og chMA79b (SEQ ID NO: 16).

5

Figur 12 viser Biacore-analyse av valgte anti-CD79b-antistoffer, herunder MA79b-podet "humanisert" antistoff (merket som "huMA79b-poding") og MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter (merket som 1–34 i den første kolonnen eller som "allstruktur" i den første kolonnen) mot det ekstracellulære domenet i humant CD79b (huCD79b-ecd-antigen). MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter omfatter en "allstruktur"-variant hvor det finnes potensielt viktige murine sekvensenheter, med varianter (merket 1–34) med kombinasjoner av sekvensmutasjoner med eller uten HVR-mutasjoner i den variable lette kjeden og den variable tunge kjeden som angitt. MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 17 (heri betegnet "huMA79b.v17") er merket som 17 i den første kolonnen, MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 18 (heri betegnet "huMA79b.v18") er merket som 18 i den første kolonnen, MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 28 (heri betegnet "huMA79b.v28") er merket som 28 i den første kolonnen, og MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 32 (heri betegnet "huMA79b.v32") er merket som 32 i den første kolonnen. Bivalent bindingsfold er representert som K_d i den særlige MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianten (merket som "K_d_{variant}") / K_d i det kimære MA79b-antistoffet (chMA79b) (merket som "K_d_{kimær}"), verdier under kolonnen merket "bivalent bindingsfold" representerer K_d_{variant} / K_d_{kimær}. Ingen påvist binding er angitt på figuren som "NDB".

Figur 13A–B (variable tunge (VH) konsensusstrukturer) og figur 14 (variable lette (VL) konsensussekvenser) viser eksempler på humane akseptorkonsensusrammeverksekvenser for anvendelse til gjennomføring av den foreliggende oppfinnelse med sekvensidentifikatorer som følger: (figur 13A–B) human undergruppe I VH-konsensusstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 108), human undergruppe I VH-konsensusstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 109–111), human undergruppe II VH-konsensusstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 112), human undergruppe II VH-konsensusstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 113–115), human undergruppe III VH-konsensusstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ

ID NO: 116), human undergruppe III VH-konsensusstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 117–119), human VH-akseptorstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 120), human VH-akseptorstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 121–122), human VH-akseptor 2-
 5 struktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 123) og human VH-akseptor 2-struktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 124–26) og (figur 14) human kappa-undergruppe I VL-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 127), human kappa-undergruppe II VL-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 128), human kappa-undergruppe III-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 129) og human kappa-
 10 undergruppe IV-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 130).

Figur 15A (lett kjede) og 15B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v17). Figur 15A (lett kjede) og 15B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i strukturen (FR), den hypervariable regionen
 15 (HVR), det første konstante domenet (CL eller CH1) og Fc-regionen (Fc) i en utførelsesform for et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v17) (SEQ ID NO: 152–159 (figur 15A) og SEQ ID NO: 160–168 (figur 15B)). Aminosyresekvenser av full lengde (variable og konstante regioner) i de lette og tunge kjedene i huMA79b.v17 er i hvert tilfelle angitt (SEQ ID NO: 303 (figur 15A) og 304
 20 (figur 15B) med de konstante domenene understreket. Aminosyresekvenser i de variable domenene er angitt (SEQ ID NO: 169 (figur 15A for lett kjede) og SEQ ID NO: 170 (figur 15B for tung kjede)).

Figur 16A (lett kjede) og 16B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v18). Figur 16A (lett kjede) og 16B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i strukturen (FR), den hypervariable regionen
 25 (HVR), det første konstante domenet (CL eller CH1) og Fc-regionen (Fc) i en utførelsesform for et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v18) (SEQ ID NO: 171–178 (figur 16A) og SEQ ID NO: 179–187 (figur 16B)). Aminosyresekvenser av full lengde (variable og konstante regioner) i de lette og tunge kjedene i huMA79b.v18 er i hvert tilfelle angitt (SEQ ID NO: 305 (figur 16A) og 306
 30 (figur 16B) med de konstante domenene understreket. Aminosyresekvenser i de variable domenene er angitt (SEQ ID NO: 188 (figur 16A for lett kjede) og SEQ ID NO: 189 (figur 16B for tung kjede)).

Figur 17A (lett kjede) og 17B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v28). Figur 17A (lett kjede) og 17B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i strukturen (FR), den hypervariable regionen (HVR), det første konstante domenet (CL eller CH1) og Fc-regionen (Fc) i en utførelsesform for et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v28) (SEQ ID NO: 190–197 (figur 17A) og SEQ ID NO: 198–206 (figur 17B). Aminosyresekvenser av full lengde (variable og konstante regioner) i de lette og tunge kjedene i huMA79b.v28 er i hvert tilfelle angitt (SEQ ID NO: 307 (figur 17A) og 308 (figur 17B) med de konstante domenenene understreket. Aminosyresekvenser i de variable domenenene er angitt (SEQ ID NO: 207 (figur 7A–B for lett kjede) og SEQ ID NO: 208 (figur 8A–B for tung kjede)).

Figur 18A (lett kjede) og 18B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v32). Figur 18A (lett kjede) og 18B (tung kjede) viser aminosyresekvenser i strukturen (FR), den hypervariable regionen (HVR), det første konstante domenet (CL eller CH1) og Fc-regionen (Fc) i en utførelsesform for et antistoff ifølge oppfinnelsen (huMA79b.v32) (SEQ ID NO: 209–216 (figur 18A) og SEQ ID NO: 217–225 (figur 18B). Aminosyresekvenser av full lengde (variable og konstante regioner) i de lette og tunge kjedene i huMA79b.v32 er i hvert tilfelle angitt (SEQ ID NO: 309 (figur 18A) og 310 (figur 18B) med de konstante domenenene understreket. Aminosyresekvenser i de variable domenenene er angitt (SEQ ID NO: 226 (figur 18A for lett kjede) og SEQ ID NO: 227 (figur 18B for tung kjede)).

Figur 19 viser sammenstillingen av aminosyresekvensene i CD79b fra menneske (SEQ ID NO: 2), cynomolgus-ape (cyno) (SEQ ID NO: 7) og mus (SEQ ID NO: 8). Menneske og cyno-CD79b har 85 % aminosyreidentitet. Signalsekvensene, testpeptidet (11-aminosyreepitopen for MA79b-, chMA79b- og anti-cyno-CD79b-antistoff beskrevet i eksempel 1, ARSEDRYRNPK (SEQ ID NO: 12)), TM-domenet (TM, transmembrane) og ITAM-domenet (ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif) er angitt. Den innrammede regionen er den regionen i CD79b som er fraværende i spleisevarianten av CD79b (beskrevet i eksempel 1).

Figur 20 er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en BJAB-luciferasexenograftmodell som viser at tilførsel av anti-CD79b-antistoff a) chMA79b-SMCC-DM1 (legemiddelmengden var ca. 2,9 (tabell 9)) og b) huMA79b

L2/H3-SMCC-DM1 (legemiddelmengden var ca. 2,4 (tabell 9)) til SCID-mus med humane B-celletumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Kontrollene omfattet Herceptin® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1).

- 5 Figur 21A er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en Granta-519-xenograftmodell (humant mantelcellelymfom) som viser at tilførsel av anti-CD79b-antistoff a) chMA79b-SMCC-DM1 (legemiddelmengden var ca. 3,6 (tabell 10)), b) huMA79b.v17-SMCC-DM1 (legemiddelmengden var ca. 3,4 (tabell 10)), c) huMA79b.v28-SMCC-DM1 (legemiddelmengden var ca. 3,3 eller
10 3,4 (tabell 10)), d) huMA79b.v18-SMCC-DM1 (legemiddelmengden var ca. 3,4 (tabell 10)) og e) huMA79b.v32-SMCC-DM1 (legemiddelmengden var ca. 2,9 (tabell 10)) til SCID-mus med humane B-celletumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Kontrollene omfattet Herceptin® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). Figur 21B er en graf for prosentvis vektendring hos musene
15 fra Granta-519-xenograftstudien (figur 21A og tabell 10), hvilken viser at det ikke var noen vesentlig vektendring i løpet av de 7 første dagene av studien. Med "hu" menes humanisert antistoff, og med "ch" menes kimært antistoff.

Figur 22 viser beskrivelser av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugater (ADC) hvor en legemiddelenhet er bundet til en konstruert cysteingruppe i: den lette kjeden (LC-ADC), den tunge kjeden (HC-ADC) og Fc-regionen (Fc-ADC).
20

Figur 23 viser: i) reduksjon av cysteindisulfidaddukter og interkjede- og intrakjededisulfider i et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff (tioMab) med reduksjonsmiddel TCEP (tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid), ii) delvis oksidering av, dvs. reoksidering for reformering av interkjede- og intrakjededisulfider, med dhAA (dehydroaskorbinsyre) og iii) konjugering av det reoksiderte antistoffet med et legemiddellinkermellomprodukt for dannelse av et
25 anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugat (ADC) av cystein.
30

Figur 24 viser A) den lette kjedens sekvens (SEQ ID NO: 229) og B) den tunge kjedens sekvens (SEQ ID NO: 228) i humanisert cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff (tio-huMA79b.v17-HC-A118C), hvor et alanin i EU-posisjon 118 (alanin 118 i sekvensposisjon, Kabat-posisjon 114) i den tunge kjeden ble endret til et cystein. En legemiddelenhet kan bindes til den konstruerte cysteingruppen i den
35

tunge kjeden. På hver figur er den endrede aminosyren angitt med dobbelt understreket fet skrift. Enkel understreking angir konstante regioner. Variable regioner er regioner som ikke er understreket. Fc-regionen er merket med kursiv skrift. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 25 viser A) den lette kjedens sekvens (SEQ ID NO: 231) og B) den tunge kjedens sekvens (SEQ ID NO: 230) i humanisert cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff (tio-huMA79b.v18-HC-A118C), hvor et alanin i EU-posisjon 118 (alanin 118 i sekvensposisjon; Kabat-posisjon 114) i den tunge kjeden ble endret til et cystein. En legemiddelenhet kan bindes til den konstruerte cysteingruppen i den tunge kjeden. På hver figur er den endrede aminosyren angitt med dobbelt understreket fet skrift. Enkel understreking angir konstante regioner. Variable regioner er regioner som ikke er understreket. Fc-regionen er merket med kursiv skrift. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 26 viser A) den lette kjedens sekvens (SEQ ID NO: 233) og B) den tunge kjedens sekvens (SEQ ID NO: 232) i humanisert cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff (tio-huMA79b.v28-HC-A118C), hvor et alanin i EU-posisjon 118 (alanin 118 i sekvensposisjon; Kabat-posisjon 114) i den tunge kjeden ble endret til et cystein. En legemiddelenhet kan bindes til den konstruerte cysteingruppen i den tunge kjeden. På hver figur er den endrede aminosyren angitt med dobbelt understreket fet skrift. Enkel understreking angir konstante regioner. Variable regioner er regioner som ikke er understreket. Fc-regionen er merket med kursiv skrift. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 27 viser A) den lette kjedens sekvens (SEQ ID NO: 235) og B) den tunge kjedens sekvens (SEQ ID NO: 234) i cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff (tio-MA79b-LC-V205C), et valin i Kabat-posisjon 205 (valin 209 i sekvensposisjon) i den lette kjeden ble endret til et cystein. En legemiddelenhet kan bindes til den konstruerte cysteingruppen i den lette kjeden. På hver figur er den endrede aminosyren angitt med dobbelt understreket fet skrift. Enkel understreking angir konstante regioner. Variable regioner er regioner som ikke er understreket. Fc-

regionen er merket med kursiv skrift. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff.

Figur 28 viser A) den lette kjedens sekvens (SEQ ID NO: 237) og B) den tunge
 5 kjedens sekvens (SEQ ID NO: 236) i cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff (tio-
 MA79b-HC-A118C), hvor et alanin i EU-posisjon 118 (alanin 118 i
 sekvensposisjon; Kabat-posisjon 114) i den tunge kjeden ble endret til et
 cystein. En legemiddelenhet kan bindes til den konstruerte cysteingruppen i den
 tunge kjeden. På hver figur er den endrede aminosyren angitt med dobbelt
 10 understreket fet skrift. Enkel understreking angir konstante regioner. Variable
 regioner er regioner som ikke er understreket. Fc-regionen er merket med kursiv
 skrift. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff.

Figur 29A–B er FACS-grafer som angir at binding av anti-CD79b (tioMAB-
 15 legemiddelkonjugater (TDC-er) ifølge oppfinnelsen binder til CD79b uttrykt på
 overflaten av BJAB-luciferaseceller) er lik for konjugerte A) LC (V205C) tioMAB-
 varianter og B) HC (A118C) tioMAB-varianter av chMA79b med MMAF.
 Påvisningen var med MS anti-humanIgG-PE. Med "tio" menes cysteinkonstruert
 antistoff.

20

Figur 30A–D er FACS-grafer som angir at binding av anti-CD79b (tioMAB-
 legemiddelkonjugater (TDC-er) ifølge oppfinnelsen binder til CD79b uttrykt på
 overflaten av BJAB-luciferaseceller) er lik for A) nakne (ukonjugerte) HC (A118C)
 tioMAB-varianter av huMA79b.v18 og konjugerte HC (A118C) tioMAB-varianter
 25 av huMA79b.v18 med de forskjellige angitte legemiddelkonjugatene (B) MMAF,
 C) MMAE og D) DM1)). Påvisningen var med MS anti-humanIgG-PE. Med "tio"
 menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 31A–D er FACS-grafer som angir at binding av anti-CD79b (tioMAB-
 30 legemiddelkonjugater (TDC-er) ifølge oppfinnelsen binder til CD79b uttrykt på
 overflaten av BJAB-luciferaseceller) er lik for A) nakne (ukonjugerte) HC (A118C)
 tioMAB-varianter av huMA79b.v28 og konjugerte HC (A118C) tioMAB-varianter
 av huMA79b.v28 med de forskjellige angitte legemiddelkonjugatene (B) MMAE,
 C) DM1 og D) MMAF)). Påvisningen var med MS anti-human-PE. Med "tio" menes
 35 cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 32A–D er FACS-grafer som angir at binding av anti-cynoCD79b (tioMAB-legemiddelkonjugater (TDC-er) ifølge oppfinnelsen binder til CD79b uttrykt på overflaten av BJAB-celler som uttrykker cynoCD79b) er lik for A) nakne (ukonjugerte) HC(A118C) tioMAB-varianter av anti-cynoCD79b (ch10D10) og
 5 konjugerte HC(A118C) tioMAB-varianter av anti-cynoCD79b (ch10D10) med de forskjellige angitte legemiddelkonjugatene (B) MMAE, C) DM1 og D) MMAF)). Påvisningen var med MS anti-huIgG-PE. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff.

10 Figur 33A er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en Granta-519-xenograftmodell (humant mantelcellelymfom) som viser at tilførsel av anti-CD79b (TDC-er som varierte etter det konstruerte cysteinets posisjon (LC (V205C) eller HC (A118C)), og/eller forskjellige legemiddeldoser) til SCID-mus med humane B-celletumorer, vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller
 15 behandlet med tio-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 11)) eller tio-chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,8 (tabell 11)) viste en vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet hu-anti-HER2-MC-MMAF og tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF og chMA79b-MC-MMAF. Figur 33B er en graf for prosentvis vektendring hos musene fra Granta-519-xenograftstudien (figur 33A og
 20 tabell 11), hvilken viser at det ikke var noen vesentlig endring i vekt i løpet av de 14 første dagene av studien. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

25 Figur 34A er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en BJAB-luciferas xenograftmodell (Burkitts lymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (MC.vcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 eller MC-MMAF) til SCID-mus med humane B-celletumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-
 30 huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,87 (tabell 12)), tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 12)) eller tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,95 (tabell 12)) viste en vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet anti-HER2-kontroller (tio-hu-
 35 anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28-kontroller

(huMA79b.v28-SMCC-DM1 og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)) og anti-CD22-kontroller (tio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). Figur 34B er en graf for prosentvis vekstendring hos musene fra BJAB-luciferasexenograftstudien (figur 34A og tabell 12), hvilken viser at det ikke var noen vesentlig endring i vekt i løpet av de 7 første dagene av studien. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 35A er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en WSU-DLCL2-xenograftmodell (diffust storcellet lymfom) som viser at tilførsel av anti-CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 eller MC-MMAF) til SCID-mus med humane B-cellettumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,87 (tabell 13)), tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 13)) eller tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,95 (tabell 13)) viste en vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28-kontroller (huMA79b.v28-SMCC-DM1 og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)) og anti-CD22-kontroller (tio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). Figur 35B er en graf for prosentvis vekstendring hos musene fra WSU-DLCL2-xenograftstudien (figur 35A og tabell 13), hvilken viser at det ikke var noen vesentlig endring i vekt i løpet av de 7 første dagene av studien. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 36 er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en DOHH2-xenograftmodell (follikulært lymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (BMPEO-DM1, MC-MMAF eller MCvcPAB-MMAE) til SCID-mus med humane B-cellettumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 14)), tio-huMA79b.v28-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,95 (tabell 14)) eller tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,87 (tabell 14)) viste en vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-

HC(A118C)-MC-MMAF, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE),
 huMA79b.v28-kontroller (huMA79b.v28-SMCC-DM1 og tio-huMA79b.v28-
 HC(A118C)) og anti-CD22-kontroller (tio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-
 MMAF). Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes
 5 humanisert antistoff.

Figur 37 er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en BJAB-luciferasexenograftmodell (Burkitts lymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-
 CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (MCvcPAB-
 10 MMAE, BMPEO-DM1 eller MC-MMAF) og/eller tilført ved forskjellige doser til
 SCID-mus med humane B-cellettumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 15)), tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-
 MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 15)) eller tio-
 15 huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 15)) viste en vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet vehikkel (bare buffer), anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28-kontroller (tio-
 20 huMA79b.v28-HC(A118C)) og anti-CD22-kontroller (tio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 38A er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en Granta-619-xenograftmodell (humant mantelcellelymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-
 25 CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (BMPEO-DM1 eller MC-MMAF) og/eller tilført ved forskjellige doser som angitt til SCID-mus med humane B-cellettumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 16)) eller tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,95 (tabell 16)) viste vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF).
 Figur 38B er en graf for prosentvis vektendring hos musene fra Granta-519-xenograftstudien (figur 38A og tabell 16), hvilken viser at det ikke var noen
 35

vesentlig vektendring i løpet av de 14 første dagene av studien. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 39 er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en WSU-DLCL2-xentograftmodell (diffust storcellet lymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (BMPEO-DM1, MC-MMAF eller MCvcPAB-MMAE) og/eller tilført ved forskjellige doser som angitt til SCID-mus med humane B-cellettumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 17)), tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 17)) eller tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 17)) viste vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet vehikkel (bare buffer) og anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 40 er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en Granta-519-xenograftmodell (humant mantelcellelymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (BMPEO-DM1 eller MCvcPAB-MMAE) og/eller tilført ved forskjellige doser som angitt til SCID-mus med humane B-cellettumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 18)) eller tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,87 (tabell 18)) viste vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

Figur 41 viser en graf for resultater av celleproliferasjonsassay in vitro med A) BJAB-, B) Granta-519- eller C) WSU-DLCL2-tumorceller, behandlet med varierende konsentrasjoner fra 0,001 til 10 000 ng TDC per ml, herunder: 1) kontroll-tio-hu-anti-gD-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (2,0 MMAE/Ab-mengde), 2) kontroll-tio-hu-anti-gD-HC(A118C)-MC-MMAF (2,1 MMAF/Ab-mengde), 3)

kontroll-tio-hu-anti-gD-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (2,1 DM1/Ab-mengde), 4) tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF (1,91 MMAF/Ab-mengde), 5) tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (1,8 DM1/Ab-mengde) og 6) tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (2,0 MMAE/Ab-mengde). Med "tio" 5 menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff. Med "gD" menes glykoprotein D.

Figur 42 viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 238) for PRO283627-cDNA, hvor SEQ ID NO: 235 er en klon betegnet "DNA548455" (heri også betegnet "cyno- 10 CD79b"). Nukleotidsekvensen koder for cynomolgus-CD79b med start- og stoppkodonene angitt med understreket fet skrift.

Figur 43 viser aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 239) avledet av kodingssekvensen av SEQ ID NO: 235 angitt på figur 42.

15

Figur 44 viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 240) i den lette kjeden av anti-cyno-CD79b-antistoff (ch10D10). Nukleotidsekvensen koder for den lette kjeden i anti-cyno-CD79b-antistoff (ch10D10) med start- og stoppkodonene angitt med understreket fet skrift.

20

Figur 45 viser aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 241), som mangler den første 18-aminosyresignalsekvensen, avledet av kodingssekvensen av SEQ ID NO: 240 angitt på figur 44. Variable regioner (SEQ ID NO: 302) er regioner som ikke er understreket.

25

Figur 46 viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 242) i den tunge kjeden i anti-cyno-CD79b-antistoff (ch10D10). Nukleotidsekvensen koder for den tunge kjeden i anti-cyno-CD79b-antistoff (ch10D10) med start- og stoppkodonene angitt med understreket fet skrift.

30

Figur 47 viser aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 243), som mangler den første 18-aminosyresignalsekvensen og det siste lysinet (K) før stoppkodonet, avledet av kodingssekvensen av SEQ ID NO: 242 angitt på figur 46. Variable regioner (SEQ ID NO: 301) er regioner som ikke er understreket.

35

Figur 48 viser A) den lette kjedens sekvens (SEQ ID NO: 245) og B) den tunge kjedens sekvens (SEQ ID NO: 244) i cysteinkonstruert anti-cyno-CD79b-antistoff (tio-anti-cynoCD79b-HC-A118C), hvor et alanin i EU-posisjon 118 (alanin 118 i sekvensposisjon; Kabat-posisjon 114) i den tunge kjeden ble endret til et cystein. Aminosyre D i EU-posisjon 6 (skyggelagt på figuren) i den tunge kjeden kan eventuelt være E. En legemiddelenhet kan bindes til den konstruerte cysteingruppen i den tunge kjeden. På hver figur er den endrede aminosyren angitt med dobbelt understreket fet skrift. Enkel understreking angir konstante regioner. Variable regioner er regioner som ikke er understreket. Fc-regionen er merket med kursiv skrift. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff.

Figur 49 viser A) den lette kjedens sekvens (SEQ ID NO: 300) og B) den tunge kjedens sekvens (SEQ ID NO: 299) i cysteinkonstruert anti-cyno-CD79b-antistoff (tio-anti-cynoCD79b-LC-V205C), hvor et valin i Kabat-posisjon 205 (valin 209 i sekvensposisjon) i den lette kjeden ble endret til et cystein. Aminosyre D i EU-posisjon 6 (skyggelagt på figuren) i den tunge kjeden kan eventuelt være E. En legemiddelenhet kan bindes til den konstruerte cysteingruppen i den tunge kjeden. På hver figur er den endrede aminosyren angitt med dobbelt understreket fet skrift. Enkel understreking angir konstante regioner. Variable regioner er regioner som ikke er understreket. Fc-regionen er merket med kursiv skrift. Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff.

Figur 50 er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en BJAB-cynoCD79b-xenograftmodell (BJAB-celler som uttrykker cynoCD79b) (Burkitts lymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-CD79b TDC-er konjugert til forskjellige linkerlegemiddelenheter (BMPEO-DM1, MC-MMAF eller MCvcPAB-MMAE) til SCID-mus med humane B-celletumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 19)), tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 19)) eller tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 19)), tio-anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,8 (tabell 19)), tio-anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF (legemiddelmengden var ca. 1,9 (tabell 19)) eller tio-anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (legemiddelmengden var ca. 1,86 (tabell 19)) viste vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene

omfattet anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

5

Figur 51 er en graf for inhibering av tumorvekst in vivo i en BJAB-cynoCD79b-xenograftmodell (BJAB-celler som uttrykker cynoCD79b) (Burkitts lymfom), hvilken viser at tilførsel av anti-CD79b-TDC-er med BMPEO-DM1-linkerlegemiddelenhet tilført ved forskjellige doser som angitt til SCID-mus med humane B-cellettumorer vesentlig inhiberet tumorvekst. Xenograftmodeller behandlet med tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,85 (tabell 20)) eller tio-anti-cyno (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (legemiddelmengden var ca. 1,8 (tabell 20)) viste vesentlig inhibering av tumorvekst under studien. Kontrollene omfattet anti-HER2-kontroller (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1) og huMA79b.v28-kontroller (tio-huMA79b.v28-HC(A118C) og anti-cynoCD79b(ch10D10)-kontroller (tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)). Med "tio" menes cysteinkonstruert antistoff, mens med "hu" menes humanisert antistoff.

10
15

DETALJERT BESKRIVELSE AV DE FORETRUKNE UTFØRELSESFORMENE

20

Oppfinnelsen stiller til rådighet sammensetninger som er nyttige for behandling av hematopoietisk tumor hos pattedyr, og anvendelse av disse stoffsammensetningene til det samme.

25 Detaljer for disse sammensetningene og anordningene er angitt heri.

I. Generelle teknikker

30

Gjennomføringen av den foreliggende oppfinnelse vil benytte, med mindre annet er angitt, klassiske teknikker for molekylær biologi (omfattende rekombinante teknikker), mikrobiologi, cellebiologi, biokjemi og immunologi, som omfattes av teknikken. Slike teknikker er utførlig forklart i litteraturen, slik som "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 og periodiske oppdateringer), "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. Definisjoner

For å tolke denne patentteksten vil følgende definisjoner gjelde, og hvis det er relevant, vil betegnelser som anvendes i entall, også omfatte flertall og omvendt. Hvis en definisjon kommer i konflikt med et dokument hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri, får nedenstående definisjon anvendelse.

Med "B-celleoverflatemarkør" eller "B-celleoverflateantigen" menes heri et antigen uttrykt på overflaten av en B-celle som kan utpekes med en antagonist som binder dertil, herunder blant annet antistoffer til et B-celleoverflateantigen eller en løselig form av et B-celleoverflateantigen som kan antagonisere binding av en ligand til det naturlig forekommende B-celleantigenet. Eksempler på B-celleoverflatemarkører omfatter leukocyttoverflatemarkørene 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 og CD86 (beskrivelser finnes i The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al., Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Andre B-celleoverflatemarkører omfatter RP105, FcRH2, B-celle-CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA og 239287. B-celleoverflatemarkøren av særlig interesse er fortrinnsvis uttrykt på B-celler sammenlignet med annet ikke-B-cellevev hos et pattedyr og kan uttrykkes på både forløper-B-celler og modne B-celler.

30

Med "CD79b" menes som anvendt heri ethvert naturlig forekommende CD79b fra en hvilken som helst virveldyrkilde, herunder pattedyr slik som primater (f.eks. mennesker, cynomolgus-aper (cyno)) og gnagere (f.eks. mus og rotter), med mindre annet er angitt. Humant CD79b betegnes heri også "PRO36249" (SEQ ID NO: 2) og kodes av nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 1) heri også betegnet

35

"DNA225786". Cynomolgus-CD79b er heri også betegnet "cyno-CD79b" eller "PRO283627" (SEQ ID NO: 239) og kodes av nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 238) heri også betegnet "DNA548455". Betegnelsen "CD79b" omfatter "full lengde", ubearbeidet CD79b og enhver form av CD79b som er et resultat av bearbeiding i cellen. Betegnelsen omfatter også naturlig forekommende varianter av CD79b, f.eks. spleisevarianter, alleliske varianter og isoformer. De heri beskrevne CD79b-polypeptidene kan isoleres fra en rekke kilder, slik som fra humane vevstyper eller fra en annen kilde, eller fremstilles ved hjelp av rekombinante eller syntetiske fremgangsmåter. Et "CD79b-polypeptid med naturlig forekommende sekvens" omfatter et polypeptid med samme aminosyresekvens som det tilsvarende CD79b-polypeptidet avledet av naturen. Slike CD79b-polypeptider med naturlig forekommende sekvens kan isoleres fra naturen eller fremstilles ved hjelp av rekombinante syntetiske midler. Betegnelsen "CD79b-polypeptid med naturlig forekommende sekvens" omfatter spesifikt naturlig forekommende trunkerte eller utskilte former av det spesifikke CD79b-polypeptidet (f.eks. et ekstracellulært domenes sekvens), naturlig forekommende variantformer (f.eks. eventuelt spleisede former) og naturlig forekommende alleliske varianter av polypeptidet. I visse utførelsesformer for oppfinnelsen er de heri beskrevne CD79b-polypeptidene med naturlig forekommende sekvens modne eller polypeptider med naturlig forekommende sekvens av full lengde omfattende aminosyresekvensene av full lengde angitt på de medfølgende figurene. Start- og stoppkodoner (hvis slike er angitt) er angitt med understreket, fet skrift på figurene. Nukleinsyreenheter angitt som "N" på de medfølgende figurene er enhver nukleinsyreenhet. Mens CD79b-polypeptidene beskrevet på de medfølgende figurene er angitt for å starte med metioninenheter heri betegnet som aminosyreposisjon 1 på figurene, er det imidlertid tenkelig og mulig at andre metioninenheter enten oppstrøms eller nedstrøms for aminosyreposisjon 1 på figurene kan anvendes som utgangsaminsyreenhet for CD79b-polypeptidene.

Med "MA79b" eller "murint CD79b-antistoff" eller "murint anti-CD79b-antistoff" menes som anvendt heri spesifikt murint monoklonalt anti-CD79b-antistoff hvor det murine monoklonale anti-CD79b-antistoffet omfatter den lette kjedens variable domene med SEQ ID NO: 10 (figur 7A-B) og den tunge kjedens variable domene med SEQ ID NO: 14 (figur 8A-B). Murint monoklonalt anti-CD79b-antistoff kan kjøpes fra kommersielle kilder, slik som Biomeda (anti-humant

CD79b-antistoff; Foster City, CA), BDbioscience (anti-humant CD79b-antistoff; San Diego, CA) eller Ancell (anti-humant CD79b-antistoff; Bayport, MN) eller dannes av hybridomklon 3A2-2E7 med deponeringsnummer HB11413 hos American Type Culture Collection (ATCC), deponert hos ATCC 20. juli 1993.

5

Med "chMA79b" eller "kimært MA79b-antistoff" menes som anvendt heri spesifikt kimært anti-humant CD79b-antistoff (som tidligere beskrevet i US-søknad nr. 11/462,336, inngitt 3. august 2006) hvor det kimære anti-CD79b-antistoffet omfatter den lette kjeden med SEQ ID NO: 4 (figur 4). Den lette kjeden med
 10 SEQ ID NO: 4 omfatter videre det variable domenet med SEQ ID NO: 10 (figur 7A-B) og den lette kjedens konstante domene i humant IgG1. Det kimære anti-CD79b-antistoffet omfatter videre den tunge kjeden med SEQ ID NO: 6 (figur 6). Den tunge kjeden med SEQ ID NO: 6 omfatter videre det variable domenet med SEQ ID NO: 14 (figur 8A-B) og den tunge kjedens konstante
 15 domene i humant IgG1.

Med "anti-cynoCD79b" eller "anti-cyno-CD79b" menes som anvendt heri antistoffer som binder til cyno-CD79b (SEQ ID NO: 239 på figur 43) (som tidligere beskrevet i US-søknad nr. 11/462,336, inngitt 3. august 2006). Med
 20 "anti-cynoCD79b(ch10D10)" eller "ch10D10" menes som anvendt heri kimært anti-cynoCD79b (som tidligere beskrevet i US-søknad nr. 11/462,336, inngitt 3. august 2006) som binder til cynoCD79b (SEQ ID NO: 239 på figur 43). Anti-cynoCD79b(ch10D10) eller ch10D10 er kimært anti-cynoCD79b-antistoff som omfatter den lette kjeden med SEQ ID NO: 241 (figur 45). Anti-
 25 cynoCD79b(ch10D10) eller ch10D10 omfatter videre den tunge kjeden med SEQ ID NO: 243 (figur 47).

Med "MA79b-poding" eller "MA79b-podet 'humanisert' antistoff" eller "huMA79b-poding" menes som anvendt heri spesifikt den poding som dannes ved poding av
 30 de hypervariable regionene fra murint anti-CD79b-antistoff (MA79b) til den humane kappa I VL-akseptorkonsensusstrukturen (huKI) og den humane III VH-konsensusstrukturen (huIII) med R71A, N73T og L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)) (se eksempel 1A og figur 7 (SEQ ID NO: 11) og 8 (SEQ ID NO: 15)).

35

Med "modifikasjon" av en aminosyreenhet/-posisjon menes som anvendt heri en endring av en primær aminosyresekvens sammenlignet med en utgangsaminosyresekvens, hvor endringen er et resultat av en sekvensendring som involverer nevnte aminosyreenhet/-posisjoner. Typiske modifikasjoner

5 omfatter for eksempel substitusjon av enheten (eller ved nevnte posisjon) med en annen aminosyre (f.eks. en konservativ eller ikke-konservativ substitusjon), insersjon av én eller flere (alminneligvis færre enn 5 eller 3) aminosyrer tilstøtende til nevnte enhet/posisjon og delesjon av nevnte enhet/posisjon. Med "aminosyresubstitusjon", eller en variasjon derav, menes utbytting av en

10 eksisterende aminosyreenhet i en forhåndsbestemt (utgangs)aminosyresekvens med en annen aminosyreenhet. Modifikasjonen resulterer alminneligvis og fortrinnsvis i endring i minst én fysikobiokjemisk aktivitet i polypeptidvarianten sammenlignet med et polypeptid omfattende utgangsaminosyresekvensen (eller "villtype"-aminosyresekvensen). For et antistoff kan en fysikobiokjemisk aktivitet

15 som er endret, for eksempel være bindingsaffinitet, bindingsevne og/eller bindingsvirkning på et målmolekyl.

Betegnelsen "antistoff" er anvendt i videste forstand og omfatter spesifikt for eksempel enkle monoklonale anti-CD79b-antistoffer (omfattende agonist,

20 antagonist, nøytraliserende antistoffer, intakte monoklonale antistoffer eller monoklonale antistoffer av full lengde), anti-CD79b-antistoffsammensetninger med polyepitopspesifisitet, polyklonale antistoffer, multivalente antistoffer, multispesifikke antistoffer (f.eks. bispesifikke antistoffer så lenge de viser ønsket biologisk aktivitet), dannet av minst to intakte antistoffer, enkjedede anti-

25 CD79b-antistoffer og fragmenter av anti-CD79b-antistoffer (se nedenfor), herunder Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragmenter, diastoffer, antistoffer med ett domene (sdAbs), så lenge de viser ønsket biologisk eller immunologisk aktivitet. Betegnelsen "immunglobulin" (Ig) anvendes synonymt med antistoff heri. Et antistoff kan være humant, humanisert og/eller affinitetsmodnet.

30

Med "anti-CD79b-antistoff" eller "et antistoff som binder til CD79b" menes et antistoff som kan binde CD79b med tilstrekkelig affinitet til at antistoffet er nyttig som et diagnostisk og/eller terapeutisk stoff til utpeking av CD79b. Graden av binding av et anti-CD79b-antistoff til et urelatert ikke-CD79b-protein

35 er fortrinnsvis mindre enn ca. 10 % av bindingen av antistoffet til CD79b som målt for eksempel ved et radioimmunassay (RIA). I visse utførelsesformer har et

antistoff som binder til CD79b, en dissosiasjonskonstant (K_d) på $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ eller $\leq 0,1 \text{ nM}$. I visse utførelsesformer binder anti-CD79b-antistoffet til en CD79b-epitop som er konservert blant CD79b fra forskjellige arter.

5

Et "isolert antistoff" er et som er identifisert og separert og/eller utvunnet fra en komponent i sitt naturlige miljø. Urene komponenter i sitt naturlige miljø er materialer som ville forstyrre terapeutiske anvendelser for antistoffet, og kan omfatte enzymer, hormoner og andre proteinholdige eller ikke-proteinholdige soluter. I foretrukne utførelsesformer vil antistoffet renses 1) til mer enn 95 vekt-% av antistoff etter bestemmelse ved Lowry-metoden, og mest foretrukket mer enn 99 vekt-%, 2) til en tilstrekkelig grad til å oppnå minst 15 enheter av N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av en sekvenator med roterende kopp eller 3) til homogenitet ved SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende forhold ved hjelp av coomassieblå eller fortrinnsvis sølvfarge. Isolert antistoff omfatter antistoffet in situ i rekombinante celler siden minst én komponent i antistoffets naturlige miljø ikke vil være til stede. Isolert antistoff vil imidlertid vanligvis fremstilles ved hjelp av minst ett rensetrinn.

20

Den grunnleggende 4-kjedede antistoffenheten er et heterotetramerisk glykoprotein sammensatt av to identiske lette (L) kjeder og to identiske tunge (H) kjeder (et IgM-antistoff består av 5 av den grunnleggende heterotetramerenheten sammen med et ytterligere polypeptid kalt J-kjede, og inneholder derfor 10 antigenbindingssteder, mens utskilte IgA-antistoffer kan polymeriseres for dannelse av polyvalente enheter omfattende 2–5 av de grunnleggende 4-kjedede enhetene sammen med J-kjede). For IgG-er er den 4-kjedede enheten vanligvis ca. 150 000 dalton. Hver L-kjede er bundet til en H-kjede ved én kovalent disulfidbinding, mens de to H-kjedene er bundet til hverandre ved én eller flere disulfidbindinger avhengig av H-kjedens isotype. Hver H- og L-kjede har også jevnt plasserte intrakjededisulfidbroer. Hver H-kjede har ved N-terminalen et variabelt domene (V_H) etterfulgt av tre konstante domener (C_H) for hver av α - og γ -kjedene og fire C_H -domener for μ - og ε -isotypene. Hver L-kjede har ved N-terminalen et variabelt domene (V_L) etterfulgt av et konstant domene (C_L) i den andre enden. V_L sammenstilles med V_H , og C_L sammenstilles med den tunge kjedens første konstante domene (C_{H1}). Særlige

35

aminosyreenheter antas å danne en fasegrense mellom den lette kjedens og den tunge kjedens variable domener. Paringen av et V_H og V_L danner til sammen et enkelt antigenbindingssted. Mer informasjon om strukturen og egenskapene til de forskjellige klassene av antistoffer finnes for eksempel i Basic and Clinical

5 Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, s. 71 og kapittel 6.

L-kjeden fra hvilke som helst virveldyrarter kan grupperes i ett av to klart atskilte typer, kalt kappa og lambda, basert på aminosyresekvensene i deres

10 konstante domener. Avhengig av aminosyresekvensen i deres tunge kjeders konstante domener (C_H) kan immunglobuliner grupperes i forskjellige klasser eller isotyper. Det finnes fem klasser av immunglobuliner: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, som har tunge kjeder, i hvert tilfelle betegnet α , δ , ϵ , γ og μ . Klassene γ og α deles ytterligere inn i underklasser på grunnlag av relativt mindre forskjeller i

15 C_H -sekvens og funksjon, f.eks. uttrykker mennesker følgende underklasser: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2.

Med "variabel region" eller "variabelt domene" i et antistoff menes de aminoternale domenene i antistoffets tunge eller lette kjede. Den tunge

20 kjedens variable domene kan kalles " V_H ". Den lette kjedens variable domene kan kalles " V_L ". Disse domenene er alminneligvis de mest variable delene av et antistoff og inneholder antigenbindingssteder.

Med "variabel" menes at visse segmenter i de variable domenene er svært

25 forskjellige i sekvens blant antistoffer. V-domenet medierer antigenbinding og definerer et særlig antistoffs spesifisitet for dets særlige antigen. Men variabiliteten er ikke jevnt fordelt over de variable domenenes 110-aminosyreområde. V-regionene består i stedet av relativt faste områder kalt sekvensregioner (FR-er) på 15–30 aminosyrer atskilt av kortere regioner med

30 ekstrem variabilitet kalt "hypervariable regioner" som i hvert tilfelle er 9–12 aminosyrer lang. De variable domenene i naturlig forekommende tunge og lette kjeder omfatter i hvert tilfelle fire FR-er, helst i en β -flakkonfigurasjon, koblet sammen av tre hypervariable regioner, som danner sløyfer som kobler sammen, og som i noen tilfeller utgjør del av, β -flakstrukturen. De hypervariable

35 regionene i hver kjede holdes tett sammen av FR-ene og bidrar, sammen med de hypervariable regionene fra den andre kjeden, til dannelsen av

antigenbindingsstedet for antistoffer (se Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). De konstante domenene er ikke direkte involvert i binding av et antistoff til et antigen, men viser forskjellige effektorfunksjoner, slik som antistoffets deltagelse i antistoffavhengig cellecytotoksitet (ADCC).

Et "intakt" antistoff er et som omfatter et antigenbindingssted og et C_L samt minst de tunge kjedenes konstante domener, C_{H1} , C_{H2} og C_{H3} . De konstante domenene kan være konstante domener med naturlig forekommende sekvens (f.eks. konstante domener med human naturlig forekommende sekvens) eller aminosyresekvensvariant derav. Det intakte antistoffet har fortrinnsvis én eller flere effektorfunksjoner.

Med "nakent antistoff" menes i denne sammenheng et antistoff som ikke er konjugert til en cytotoxisk enhet eller radiomarkør.

"Antistofffragmenter" omfatter en del av et intakt antistoff, fortrinnsvis det intakte antistoffets antigenbinding eller variable region. Eksempler på antistofffragmenter omfatter Fab-, Fab'-, $F(ab')_2$ - og Fv-fragmenter, diastoffer, lineære antistoffer (se US-patent nr. 5 641 870, eksempel 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)), enkjedede antistoffmolekyler og multispesifikke antistoffer dannet av antistofffragmenter. I en utførelsesform omfatter et antistofffragment et antigenbindingssted av det intakte antistoffet og beholder dermed evnen til å binde antigen.

Papain-nedbryting av antistoffer produserer to identiske antigenbindingsfragmenter kalt "Fab"-fragmenter, og et overskytende "Fc"-fragment, en betegnelse som gjenspeiler evnen til enkelt å krystallisere. Fab-fragmentet består av en hel L-kjede sammen med H-kjedens variable domene (V_H), og det første konstante domenet i én tung kjede (C_{H1}). Hvert Fab-fragment er monovalent med hensyn til antigenbinding, dvs. det har et enkelt antigenbindingssted. Pepsin-behandling av et antistoff gir et enkelt stort $F(ab')_2$ -fragment som i grove trekk tilsvarende to disulfidbundne Fab-fragmenter som har divalent antigenbindingsaktivitet og fortsatt kan kryssbinde antigen. Fab'-fragmenter skiller seg fra Fab-fragmenter ved at de har ytterligere få enheter ved C_{H1} -domenets karboksyterminal, omfattende én eller flere cysteiner fra

antistoffets hengselsregion. Fab'-SH er betegnelsen heri for Fab' hvor cysteinenhetene fra de konstante domenene bærer en fri tiolgruppe. F(ab')₂-antistofffragmenter ble opprinnelig produsert som par av Fab'-fragmenter som har hengelscysteiner mellom seg. Andre kjemiske koblinger av antistofffragmenter er også kjent.

Fc-fragmentet omfatter karboksyterminalens deler av begge H-kjedene holdt sammen av disulfider. Antistoffers effektorfunksjoner er bestemt av sekvenser i Fc-regionen, hvilken region også er den delen som gjenkjennes av Fc-reseptorer (FcR) som finnes på visse celletyper.

"Fv" er det minste antistofffragmentet som inneholder et fullstendig gjenkjennings- og bindingssted for antigen. Dette fragmentet består av en dimer av én tung kjedes og én lett kjedes variable domene i tett, ikke-kovalent assosiasjon. I en enkjedet Fv-art (scFv) kan én tung kjedes og én lett kjedes variable domene være kovalent bundet av en fleksibel peptidbinding, slik at de lette og tunge kjedene kan bindes i en "dimerisk" struktur analog til strukturen i en tokjedet Fv-art. Fra foldingen av disse to domenene kommer seks hypervariable sløyfer (3 sløyfer hver fra H- og L-kjeden) som bidrar til aminosyreenhetene for antigenbinding og gir antistoffet antigenbindingsspesifisitet. Også et enkelt variabelt domene (eller halvparten av et Fv omfattende bare tre CDR-er spesifikke for et antigen) har imidlertid evnen til å gjenkjenne og binde antigen, selv om dette er ved en lavere affinitet enn hele bindingsstedet.

"Enkjedet Fv", også forkortet "sFv" eller "scFv", er antistofffragmenter som omfatter V_H- og V_L-antistoffdomenene som er koblet sammen til en enkelt polypeptidkjede. sFv-polypeptidet omfatter videre fortrinnsvis en polypeptidbinding mellom V_H- og V_L-domenene som aktiverer sFv-et for dannelsen av ønsket struktur for antigenbinding. En oversikt over sFv finnes i Pluckthun i The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, s. 269–315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

Med "diastoffer" menes antistofffragmenter med to antigenbindingssteder, hvor fragmentene omfatter en tung kjedes variable domene (VH) koblet til en lett kjedes variable domene (VL) i den samme polypeptidkjeden (VH-VL). De små

antistofffragmentene fremstilles ved konstruksjon av sFv-fragmenter (se foregående avsnitt) med korte bindinger (ca. 5–10 enheter) mellom V_H- og V_L-domenene slik at interkjede-, men ikke intrakjedeparing av V-domenene oppnås, hvilket resulterer i et bivalent fragment, dvs. et fragment med to

5 antigenbindingssteder. Diastoffer kan være bivalente eller bispesifikke. Bispesifikke diastoffer er heterodimere av to "crossover"-sFv-fragmenter hvor de to antistoffenes V_H- og V_L-domener finnes på forskjellige polypeptidkjeder. Mer utførlig informasjon om diastoffer finnes for eksempel i EP 404 097; WO 93/11161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129–134 (2003) og Hollinger et al., Proc.

10 Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444–6448 (1993). Triastoffer og tetrastoffer er også beskrevet i Hudson et al., Nat. Med. 9:129–134 (2003).

Med "monoklonalt antistoff" menes som anvendt heri et antistoff oppnådd fra en populasjon av vesentlig homogene antistoffer, dvs. at de enkelte antistoffer

15 omfattende populasjonen er identiske med unntak av mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke, idet de rettes mot et enkelt antigensted. I motsetning til polyklonale antistoffremstillinger som omfatter forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), er hvert

20 monoklonalt antistoff videre rettet mot en enkelt determinant på antigenet. I tillegg til deres spesifisitet er de monoklonale antistoffene fordelaktige fordi de kan syntetiseres ukontaminert av andre antistoffer. Betegnelsen "monoklonal" skal ikke tolkes dithen at antistoffets fremstilling krever ved en særlig fremgangsmåte. De monoklonale antistoffene som er nyttige i den foreliggende

25 oppfinnelse, kan for eksempel fremstilles ved hybridometoden først beskrevet av Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), eller kan fremstilles ved rekombinante DNA-metoder i bakterielle, eukaryotiske dyre- eller planteceller (se for eksempel US-patent nr. 4 816 567). De "monoklonale antistoffene" kan også isoleres fra fagantistoffbiblioteker ved hjelp av teknikkene beskrevet i for eksempel Clackson

30 et al., Nature, 352:624–628 (1991) og Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581–597 (1991).

De monoklonale antistoffene heri omfatter "kimære" antistoffer hvor en del av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med eller homolog til tilsvarende

35 sekvens i antistoffer avledet av en særlig art eller tilhørende en særlig antistoffklasse eller -underklasse, mens resten av kjedene er identisk med eller

homolog til tilsvarende sekvens i antistoffer avledet av andre arter eller tilhørende andre antistoffklasser eller -underklasser samt fragmenter av slike antistoffer, så lenge de viser ønsket biologisk aktivitet (se US-patent nr. 4 816 567; og Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Kimære antistoffer av interesse heri omfatter "primatiserte" antistoffer omfattende variable domeners antigenbindingssekvenser avledet av en ikke-human primat (f.eks. dyreape, menneskeape osv.), og humane konstante regioners sekvenser.

- 10 "Humaniserte" former av ikke-humane antistoffer (f.eks. gnager) er kimære antistoffer som inneholder minimal sekvens avledet av det ikke-humane antistoffet. Humaniserte antistoffer er for det meste humane immunglobuliner (mottagerantistoff) hvor enheter fra en hypervariabel region hos mottageren utbyttes med enheter fra en hypervariabel region av en ikke-human art
- 15 (donorantistoff) slik som mus, rotte, kanin eller ikke-human primat med ønsket antistoffspesifisitet, -affinitet og -evne. Strukturregionenheter (FR) av det humane immunglobulinet utbyttes i enkelte tilfeller med tilsvarende ikke-humane enheter. Humaniserte antistoffer kan videre omfatte enheter som ikke finnes i mottagerantistoffet eller i donorantistoffet. Disse modifikasjonene foretas
- 20 for ytterligere å raffinere antistoffytelsen. Det humaniserte antistoffet vil alminneligvis i det vesentlige omfatte alle av minst ett, og typisk to, variable domener, hvor alle eller i det vesentlige alle de hypervariable sløyfene tilsvarer dem for et ikke-humant immunglobulin og alle eller i det vesentlige alle av FR-ene er dem for en human immunglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet vil
- 25 eventuelt også omfatte minst en del av et immunglobulins konstante region (Fc), som typisk er den for et humant immunglobulin. Mer informasjon finnes i Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) og Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Se også følgende oversiktsartikler og deri siterte henvisninger: Vaswani and Hamilton, Ann.
- 30 Allergy, Asthma and Immunol., 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions, 23:1035-1038 (1995), Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech., 5:428-433 (1994).

- Med "tio" menes som anvendt heri om et antistoff et cysteinkonstruert antistoff,
- 35 mens med "hu" som anvendt heri om et antistoff menes et humanisert antistoff.

Et "humant antistoff" er et som har en aminosyresekvens som tilsvarer den for et antistoff produsert av et menneske og/eller fremstilt ved en hvilken som helst av teknikkene for fremstilling av humane antistoffer som beskrevet heri. Denne definisjonen av et humant antistoff utelukker spesifikt et humanisert antistoff

5 omfattende ikke-humane antigenbindingsenheter. Humane antistoffer kan fremstilles ved forskjellige teknikker som er kjent i teknikken, herunder fagvisningsbiblioteker. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991), Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Også tilgjengelige for fremstillingen av humane monoklonale antistoffer er fremgangsmåter beskrevet i Cole et al.,

10 *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, s. 77 (1985), Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86–95 (1991). Se også van Dijk og van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368–74 (2001). Humane antistoffer kan fremstilles ved tilførsel av antigenet til et transgent dyr som er modifisert til å produsere slike antistoffer ved antigenprovokasjon, men hvor endogene loki er deaktivert,

15 f.eks. immuniserte xenomus (se for eksempel US-patent nr. 6 075 181 og 6 150 584 angående XENOMOUSE™-teknologi). Se også for eksempel Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557–3562 (2006) angående humane antistoffer dannet via en human B-cellehybridomteknologi.

20 Med "hypervariabel region", "HVR" eller "HV" menes som anvendt heri regionene av et antistoffs variable domene som er hypervariable i sekvens og/eller danner strukturelt definerte sløyfer. Antistoffer omfatter alminneligvis seks hypervariable regioner, tre i VH-en (H1, H2, H3) og tre i VL-en (L1, L2, L3). En rekke fremstillinger av hypervariable regioner anvendes og er integrert heri.

25 Kabats komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er) er basert på sekvensvariabilitet og er de mest anvendte (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia viser i stedet til plasseringen av de strukturelle sløyfene (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987)).

30 Slutten på Chothias CDR-H1-sløyfe ved Kabat-nummerering varierer mellom H32 og H34 avhengig av sløyfens lengde (dette er fordi Kabat-nummereringsskjemaet plasserer insersjonene ved H35A og H35B; hvis verken 35A eller 35B finnes, slutter sløyfen ved 32; hvis bare 35A finnes, slutter sløyfen ved 33; hvis både 35A og 35B finnes, slutter sløyfen ved 34). De hypervariable

35 AbM-regionene representerer et kompromiss mellom Kabats CDR-er og Chothias strukturelle sløyfer, og anvendes av Oxford Moleculars AbM-

antistoffmodelleringsprogramvare. De hypervariable "kontakt"-regionene er basert på en analyse av de tilgjengelige komplekse krystallstrukturene. Enhetene fra hver av disse hypervariable regionene er nevnt nedenfor.

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

5

Hypervariable regioner kan omfatte "utvidede hypervariable regioner" som følger: 24-36 eller 24-34 (L1), 46-56 eller 50-56 (L2) og 89-97 (L3) i VL-en og 26-35B (H1), 50-65, 47-65 eller 49-65 (H2) og 93-102, 94-102 eller 95-102 (H3) i VH-en. De variable domeneenheterne er nummerert ifølge Kabat *et al.*, *ovenfor* for hver av disse definisjonene.

10

"Struktur"- eller "FR"-enheter er de variable domeneenheter som ikke er de hypervariable regionsenheterne som er definert heri.

15

Med "variabel domeneenhetsnummerering ifølge Kabat" eller "aminoesyreposisjonsnummerering ifølge Kabat", og variasjoner derav, menes nummereringssystemet anvendt for tunge kjeders variable domener eller lette kjeders variable domener for kompilering av antistoffer i Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Ved hjelp av dette nummereringssystemet kan den faktiske lineære aminosyresekvensen inneholde

20

færre eller flere aminosyrer tilsvarende en forkortelse av, eller insersjon i, en FR eller CDR av det variable domenet. En tung kjedes variable domene kan for eksempel omfatte en enkelt aminosyreinsersjon (enhet 52a ifølge Kabat) etter enhet 52 av H2 og innsatte enheter (f.eks. enhet 82a, 82b og 82c osv. ifølge Kabat) etter den tunge kjedens FR-enhet 82. Kabat-nummereringen av enheter kan bestemmes for et bestemt antistoff ved sammenstilling i homologiregioner av antistoffets sekvens med en "alminnelig" Kabat-nummerert sekvens.

Kabat-nummereringssystemet anvendes alminneligvis ved henvisning til en enhet i det variable domenet (ca. enhet 1–107 av den lette kjeden og enhet 1–113 av den tunge kjeden) (f.eks. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "EU-nummereringssystemet" eller "EU-indeksen" anvendes alminneligvis ved henvisning til immunglobulin i en tung kjedes konstante region (f.eks. EU-indeksen rapportert i Kabat *et al. ovenfor*). Med "EU-indeksen ifølge Kabat" menes det humane IgG1 EU-antistoffets enhetsnummerering. Med mindre annet er angitt heri, menes med henvisninger til enhetsnumre i det variable domenet i antistoffer enhetsnummerering ved Kabat-nummereringssystemet. Med mindre annet er angitt heri, menes med henvisninger til enhetsnumre i det konstante domenet i antistoffer enhetsnummerering ved EU-nummereringssystemet (se f.eks. den provisoriske US-søknad nr. 60/640,323, figurer for EU-nummerering).

Et "affinitetsmodnet" antistoff er et med én eller flere endringer i én eller flere HVR-er derav som resulterer i en forbedring i antistoffets affinitet for antigen, sammenlignet med et morantistoff som ikke har disse endringene. Foretrukne affinitetsmodnede antistoffer vil ha nanomolar eller til og med pikomolar affinitet for målantigenet. Affinitetsmodnede antistoffer produseres ved fremgangsmåter som er kjent i teknikken. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779–783 (1992) beskriver affinitetsmodning ved en blanding av VH- og VL-domenene. Tilfeldig mutagenese av HVR og/eller strukturenheter er beskrevet av: 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) og Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 226:889–896 (1992).

Et "blokkerende" antistoff eller et "antagonist"-antistoff er et som inhiberer eller reduserer biologisk aktivitet for antigenet som det binder. Foretrukne blokkerende antistoffer eller antagonistantistoffer inhiberer i det vesentlige eller fullstendig antigenets biologiske aktivitet.

5

Et "agonistantistoff" er som anvendt heri et antistoff som kopierer minst én av funksjonsaktivitetene til et polypeptid av interesse.

Et "artsavhengig antistoff," f.eks. et anti-humant IgE-antistoff hos pattedyr, er et antistoff som har en sterkere bindingsaffinitet for et antigen fra en første pattedyrart enn det har for en homolog av dette antigenet fra en andre pattedyrart. Det artsavhengige antistoffet "binder spesifikt" normalt til et humant antigen (dvs. har en bindingsaffinitetsverdi (Kd) på høyst ca. 1×10^{-7} M, fortrinnsvis høyst ca. 1×10^{-8} og mest foretrukket høyst ca. 1×10^{-9} M), men har en bindingsaffinitet for en homolog av antigenet fra en andre ikke-human pattedyrart som er minst ca. 50 ganger, eller minst ca. 500 ganger, eller minst ca. 1000 ganger svakere enn bindingsaffiniteten for det humane antigenet. Det artsavhengige antistoffet kan være et hvilket som helst av de forskjellige ovenfor definerte antistofftypene, men er fortrinnsvis et humanisert eller humant antistoff.

Med "bindingsaffinitet" menes alminneligvis styrken av summen av ikke-kovalente vekselvirkninger mellom et enkelt bindingssted for et molekyl (f.eks. et antistoff) og dets bindingspartner (f.eks. et antigen). Med mindre annet er angitt, menes med "bindingsaffinitet" som anvendt heri egen bindingsaffinitet som gjenspeiler en vekselvirkning på 1 : 1 mellom medlemmer av et bindingspar (f.eks. antistoff og antigen). Et molekyl Xs affinitet for sin partner Y kan alminneligvis representeres ved dissosiasjonskonstanten (Kd). Affinitet kan måles ved alminnelige fremgangsmåter som er kjent i teknikken, herunder dem som er beskrevet heri. Antistoffer med lav affinitet binder alminneligvis antigen langsomt og har en tendens til å dissosiere lett, mens antistoffer med høy affinitet alminneligvis binder antigen raskere og har en tendens til å forbli bundet lenger. En rekke fremgangsmåter for måling av bindingsaffinitet er kjent i teknikken, og en hvilken som helst av disse kan anvendes for formål ifølge den foreliggende oppfinnelse. Spesifikt illustrative utførelsesformer er beskrevet i det følgende.

Med "minst" menes som anvendt heri om bindingsaffinitet en sterkere binding mellom et molekyl og dets bindingspartner. Med "minst" menes som anvendt heri en sterkere binding, representert ved en mindre Kd-tallverdi. Hvis et
5 antistoff som har en affinitet for et antigen på for eksempel "minst 0,6 nM", er antistoffets affinitet for antigenet < 0,6 nM, dvs. 0,59 nM, 0,58 nM, 0,57 nM osv. eller enhver verdi mindre enn 0,6 nM.

En "Kd" eller "Kd-verdi" kan måles ved et radiomerket antigenbindingsassay
10 (RIA) utført med Fab-versjonen av et antistoff av interesse og dets antigen som beskrevet ved følgende assay som måler Fab-ers løsningsbindingsaffinitet for antigen ved ekvibrering av Fab med en minimal konsentrasjon av (¹²⁵I)-merket antigen under nærvær av en titreringsserie av umerket antigen og deretter innfangning av bundet antigen med en anti-Fab-antistoffbelagt plate (Chen et al.,
15 (1999) J. Mol Biol 293:865–881). For å fastsette betingelser for assayet belegges mikrotiterplater (Dynex) over natten med 5 µg/ml av et innfangende anti-Fab-antistoff (Cappel Labs) i 50 mM natriumkarbonat (pH 9,6) og blokkeres deretter med 2 vekt-% bovint serumalbumin i PBS i to til fem timer ved romtemperatur (ca. 23 °C). I en ikke-adsorbant plate (Nunc #269620) blandes
20 100 pM eller 26 pM [¹²⁵I]-antigen med seriefortynninger av et Fab av interesse (f.eks. i samsvar med vurdering av et anti-VEGF-antistoff, Fab-12, i Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593–4599). Fab-et av interesse inkuberes deretter over natten, men inkuberingen kan fortsette over lengre tid (f.eks. 65 timer) for å oppnå likevekt. Deretter overføres blandingene til innfangingsplaten for
25 inkubering ved romtemperatur (f.eks. i en time). Løsningen fjernes deretter, og platen skylles åtte ganger med 0,1 % Tween-20 i PBS. Når platene er tørre, tilsettes 150 µl/brønn med scintillasjonsmiddel (MicroScint-20; Packard), og platene telles på en Topcount-gammateller (Packard) i ti minutter. Konsentrasjoner av hvert Fab som gir mindre enn eller lik 20 % av maksimal
30 binding, velges for anvendelse i kompetitive bindingsassayer. Ifølge en annen utførelsesform måles Kd eller Kd-verdi ved hjelp av overflateplasmonresonansassayer på en BIAcore™-2000 eller en BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ved 25 °C med immobiliserte antigen-CM5-brikker ved ~10 responsenheter (RU). Karboksymetylerede dekstranbiosensorbrikker (CM5, BIAcore Inc.)
35 aktiveres kort med N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimidhydroklorid (EDC) og N-hydroksysukkinimid (NHS) i henhold til leverandørens anvisninger.

Antigen fortynnes med 10 mM natriumacetat, pH 4,8, i 5 ug/ml (~0,2 uM) før injeksjon ved en strømningshastighet på 5 ul/minutt for å oppnå ca. 10 respon-

senheter (RU) av koblet protein. Etter injeksjonen av antigenet injiseres 1 M etanolamin for å blokkere uomsatte grupper. For kinetiske målinger injiseres

5 dobbelt så mange seriefortynninger av Fab (0,78 nM til 500 nM) i PBS med 0,05 % Tween 20 (PBST) ved 25 °C ved en strømningshastighet på ca. 25 ul/min. Assosiasjonshastigheter (k_{on}) og dissosiasjonshastigheter (k_{off}) beregnes ved hjelp av en enkel én-til-én-Langmuir-bindingsmodell (BIAcore Evaluation Software versjon 3.2) ved samtidig tilpasning av assosiasjons- og

10 dissosiasjonssensorgrammet. Likevektdissosiasjonskonstanten (K_d) beregnes som forholdet k_{off}/k_{on} . Se for eksempel Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Hvis på-hastigheten overskrider $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ på overflateplasmonresonansanalysen ovenfor, kan på-hastigheten bestemmes ved hjelp av en fluorescerende bråkjølingsteknikk som måler økningen eller

15 reduksjonen i fluorescerende strålingsintensitet (magnetisering = 295 nm, stråling = 340 nm, 16 nm båndpassering) ved 25 °C for et 20 nM anti-antigenantistoff (Fab-form) i PBS, pH 7,2, under nærvær av økende konsentrasjoner av antigen som målt på et spektrometer, slik som et strømningsstoppstyrt spektrometer (Aviv Instruments) eller et SLM-Aminco-

20 spektrometer i 8000-serien (ThermoSpectronic) med en rød omrøringskyvette.

En "på-hastighet" eller "hastighet for assosiasjon" eller "assosiasjonshastighet" eller " k_{on} " kan også ifølge denne oppfinnelsen bestemmes ved hjelp av den samme overflateplasmonresonansteknikken som beskrevet ovenfor på en

25 BIAcore™-2000 eller en BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) som beskrevet ovenfor.

Med "i det vesentlige lik" eller "i det vesentlige det samme" menes som anvendt heri at det angis en tilstrekkelig høy grad av likhet mellom to tallverdier (den

30 ene vanligvis assosiert med et antistoff ifølge oppfinnelsen og den andre assosiert med et referanse-/komparatorantistoff) slik at en fagperson vil anse forskjellen mellom de to verdiene for å ha liten eller ingen biologisk og/eller statistisk betydning i forbindelse med den biologiske karakteristikken målt ved nevnte verdier (f.eks. K_d -verdier). Forskjellen mellom nevnte to verdier er

35 fortrinnsvis mindre enn ca. 50 %, fortrinnsvis mindre enn ca. 40 %, fortrinnsvis

mindre enn ca. 30 %, fortrinnsvis mindre enn ca. 20 %, fortrinnsvis mindre enn ca. 10 % som en funksjon av verdien for referanse-/komparatorantistoffet.

- Med "i det vesentlige redusert" eller "i det vesentlige forskjellig" menes som
- 5 anvendt heri at det angis en tilstrekkelig høy grad av forskjell mellom to tallverdier (den ene vanligvis assosiert med et antistoff ifølge oppfinnelsen og den andre assosiert med et referanse-/komparatorantistoff) slik at en fagperson vil anse forskjellen mellom de to verdiene for å ha statistisk betydning i forbindelse med den biologiske karakteristikken målt ved nevnte verdier (f.eks.
- 10 K_d-verdier, HAMA-respons). Forskjellen mellom nevnte to verdier er fortrinnsvis større enn ca. 10 %, fortrinnsvis større enn ca. 20 %, fortrinnsvis større enn ca. 30 %, fortrinnsvis større enn ca. 40 %, fortrinnsvis større enn ca. 50 % som en funksjon av verdien for referanse-/komparatorantistoffet.
- 15 Et "antigen" er et forhåndsbestemt antigen hvortil et antistoff kan binde selektivt. Målantigenet kan være polypeptid, karbohydrat, nukleinsyre, lipid, hapten eller andre naturlig forekommende eller syntetiske forbindelser. Målantigenet er fortrinnsvis et polypeptid.
- 20 Med "human akseptorstruktur" menes i denne sammenheng en struktur omfattende aminosyresekvensen i en VL- eller VH-struktur avledet av en human immunglobulinstruktur, eller fra en human konsensusstruktur. En human akseptorsstruktur "avledet av" en human immunglobulinstruktur eller human konsensusstruktur kan omfatte den samme aminosyresekvensen derav, eller kan
- 25 inneholde allerede eksisterende aminosyresekvensendringer. Hvis allerede eksisterende aminosyreendringer finnes, fortrinnsvis høyst 5 og fortrinnsvis høyst 4, eller høyst 3, finnes det allerede eksisterende aminosyreendringer. Hvis allerede eksisterende aminosyreendringer finnes i en VH, er disse endringene fortrinnsvis bare ved tre, to eller en av posisjon 71H, 73H og 78H;
- 30 aminosyreenhetene ved disse posisjonene kan være 71A, 73T og/eller 78A. I en utførelsesform er VL i den humane akseptorstrukturen identisk i sekvens med VL i den humane immunglobulinrammeverksekvensen eller humane konsensusrammeverksekvensen.
- 35 En "human konsensusstruktur" er en struktur som representerer den vanligst forekommende aminosyreenheten i et utvalg av humane immunglobulin VL- eller

VH-rammeverksekvenser. Utvalget av humane immunglobulin VL- eller VH-sekvenser er alminneligvis fra en undergruppe av variable domenesekvenser. Undergruppen av sekvenser er alminneligvis en undergruppe ifølge Kabat *et al.* I en utførelsesform for VL er undergruppen kappa-undergruppe I ifølge Kabat *et al.* I en utførelsesform for VH er undergruppen undergruppe III ifølge Kabat *et al.*

En "undergruppe III VH-konsensusstruktur" omfatter konsensussekvensen oppnådd fra aminosyresekvensene i variabel tung undergruppe III ifølge Kabat *et al.* I en utførelsesform omfatter undergruppe III VH-konsensusstrukturaminosyresekvensen minst en del eller alle de følgende sekvensene: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145)-H3-WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 146).

En "undergruppe I VL-konsensusstruktur" omfatter konsensussekvensen oppnådd fra aminosyresekvensene i variabel lett kappa-undergruppe III ifølge Kabat *et al.* I en utførelsesform omfatter undergruppe I VL-konsensusstrukturaminosyresekvensen minst en del av eller alle de følgende sekvensene: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 139)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

En "umodifisert human struktur" er en human struktur som har den samme aminosyresekvensen som den humane akseptorstrukturen, f.eks. mangler den humane til ikke-humane aminosyresubstitusjoner i den humane akseptorsstrukturen.

Med "endret hypervariabel region" menes i denne sammenheng en hypervariabel region omfattende én eller flere (f.eks. én til ca. 16) aminosyresubstitusjoner deri.

Med "umodifisert hypervariabel region" menes i denne sammenheng en hypervariabel region som har den samme aminosyresekvensen som et ikke-

humant antistoff som den ble avledet av, dvs. en som mangler én eller flere aminosyresubstitusjoner deri.

Et antistoff "som binder" et antigen av interesse, f.eks. et tumorassosiert polypeptidantigenmål, er et som binder antigenet med tilstrekkelig affinitet slik at antistoffet er nyttig som et terapeutisk stoff til utpeking av en celle, eller et vev som uttrykker antigenet, og som ikke i vesentlig grad kryssreagerer med andre proteiner. I slike utførelsesformer vil graden av binding av antistoffet til et "ikke-mål"-protein være mindre enn ca. 10 % av antistoffets binding til sitt særlige målprotein som bestemt av fluorescensaktivert cellosteringsanalyse (FACS) eller radioimmunutfelling (RIA). Med hensyn til bindingen av et antistoff til et målmolekyl menes med "spesifikk binding" eller "binder spesifikt til" eller er "spesifikk for" et særlig polypeptid eller en epitop på et særlig polypeptidmål binding som er målbart forskjellig fra en ikke-spesifikk vekselvirkning. Spesifikk binding kan for eksempel måles ved bestemmelse av binding av et molekyl sammenlignet med binding av et kontrollmolekyl, som alminneligvis er et molekyl av lignende struktur som ikke har bindingsaktivitet. Spesifikk binding kan for eksempel bestemmes ved konkurranse med et kontrollmolekyl som er likt målet, f.eks. et overskudd av ikke-merket mål. I dette tilfellet er spesifikk binding indikert hvis bindingen av det merkede målet til en sonde er kompetitivt inhiberet av et overskudd av umerket mål. Med "spesifikk binding" eller "binder spesifikt til" eller er "spesifikk for" et særlig polypeptid eller en epitop på et særlig polypeptidmål menes som anvendt heri for eksempel et molekyl som har en K_d for målet på minst ca. 10^{-4} M, eventuelt minst ca. 10^{-5} M, eventuelt minst ca. 10^{-6} M, eventuelt minst ca. 10^{-7} M, eventuelt minst ca. 10^{-8} M, eventuelt minst ca. 10^{-9} M, eventuelt minst ca. 10^{-10} M, eventuelt minst ca. 10^{-11} M, eventuelt minst ca. 10^{-12} M, eller mer. I en utførelsesform menes med "spesifikk binding" en binding hvor et molekyl binder til et særlig polypeptid eller en epitop på et særlig polypeptid uten i det vesentlige å binde til et hvilket som helst annet polypeptid eller polypeptidepitop.

Et antistoff som "inhiberer veksten av tumorceller som uttrykker et CD79b-polypeptid", eller et "vekstinhiberende" antistoff, er et som resulterer i målbar vekstinhibering av kreftceller som uttrykker eller overuttrykker det egnede CD79b-polypeptidet. CD79b-polypeptidet kan være et transmembrant polypeptid uttrykt på overflaten av en kreftcelle eller kan være et polypeptid som er

produsert og utskilt av en kreftcelle. Foretrukne vekstinhiberende anti-CD79b-antistoffer inhiberer vekst av CD79b-uttrykkende tumorceller med mer enn 20 %, fortrinnsvis fra ca. 20 % til ca. 50 %, og enda mer foretrukket med mer enn 50 % (f.eks. fra ca. 50 % til ca. 100 %) sammenlignet med den egnede kontrollen, idet kontrollen vanligvis er tumorceller som ikke er behandlet med antistoffet som testes. I en utførelsesform måles vekstinhibering ved en antistoffkonsentrasjon fra ca. 0,1 til 30 µg/ml eller fra ca. 0,5 nM til 200 nM i cellekultur, hvor vekstinhiberingen er bestemt 1–10 dager etter eksponering av tumorceller for antistoffet. Vekstinhibering av tumorceller *in vivo* kan bestemmes på forskjellige måter, slik som beskrevet under Eksempler nedenfor. Antistoffet er vekstinhiberende *in vivo* hvis tilførsel av anti-CD79b-antistoffet fra ca. 1 µg/kg til ca. 100 mg/kg kroppsvekt resulterer i reduksjon i tumorstørrelse eller tumorcelleproliferasjon innen ca. 5 dager til 3 måneder fra første tilførsel av antistoffet, fortrinnsvis innen ca. 5 til 30 dager.

15

Et antistoff som "induserer apoptose", er et som induserer programmert celledød som bestemt ved binding av aneksin-V, fragmentering av DNA, cellekrymping, utvidelse av endoplasmisk retikulum, cellefragmentering og/eller dannelse av membranvesikler (kalt apoptotiske stoffer). Cellen er vanligvis en som overuttrykker et CD79b-polypeptid. Cellen er fortrinnsvis en tumorcelle, f.eks. en hematopoietisk celle, slik som en B-celle, T celle, basofil, eosinofil, neutrofil, monocytt, blodplate eller erytrocytt. En rekke fremgangsmåter er tilgjengelige for evaluering av cellehendelser assosiert med apoptose. Translokasjon av fosfatidylserin (PS) kan for eksempel måles ved aneksinbinding, DNA-fragmentering kan evalueres ved DNA-laddering, og nukleær-/kromatinkondensering sammen med DNA-fragmentering kan evalueres ved enhver økning i hypodiploidceller. Antistoffet som induserer apoptose, er fortrinnsvis et som resulterer i ca. 2 til 50 ganger, fortrinnsvis ca. 5 til 50 ganger og mest foretrukket ca. 10 til 50 ganger, induksjon av aneksinbinding i forhold til ubehandlet celle i et aneksinbindingsassay.

30

Et antistoff som "induserer celledød", er et som forårsaker at en levedyktig celle blir ikke-levedyktig. Cellen er en som uttrykker et CD79b-polypeptid, og er av en celletype som i det vesentlige uttrykker eller overuttrykker et CD79b-polypeptid. Cellen kan være kreftfremkallende eller normale celler av den særlige celletypen. CD79b-polypeptidet kan være et transmembrant polypeptid uttrykt på overflaten

35

av en kreftcelle eller kan være et polypeptid som er produsert og utskilt av en kreftcelle. Cellen kan være en kreftcelle, f.eks. en B-celle eller T-celle. Celledød *in vitro* kan bestemmes under fravær av komplement- og immuneffektorceller for å påvise celledød induert av antistoffavhengig cellemediert cytotoxicitet (ADCC) eller komplementavhengig cytotoxicitet (CDC). Assayet for celledød kan 5 således utføres ved hjelp av varmeinaktivert serum (dvs. under fravær av komplement) og under fravær av immune effektorceller. For å bestemme om antistoffet kan indusere celledød, kan tap av membranintegritet som evaluert ved opptak av propidiumiodid (PI), trypanblått (se Moore et al. Cytotechnology 10 17:1–11 (1995)) eller 7AAD vurderes i forhold til ubehandlede celler. Foretrukne celledøndinduserende antistoffer er dem som induserer PI-opptak i PI-opptaksanalysen i BT474-celler.

Med "effektorfunksjoner" for antistoffer menes deres biologiske aktiviteter som 15 kan tilskrives Fc-regionen (en Fc-region med naturlig forekommende sekvens eller en Fc-region med aminosyresekvensvariant) i et antistoff, og disse varierer med antistoffets isotype. Eksempler på antistoffeffektorfunksjoner omfatter: C1q-binding og komplementavhengig cytotoxicitet, Fc-reseptorbinding, antistoffavhengig cellemediert cytotoxicitet (ADCC), fagocytose, nedregulering av 20 celleoverflatereseptorer (f.eks. B-cellereseptor) og B-celleaktivering.

Betegnelsen "Fc-region" anvendes heri for å definere en C-terminal region i et immunglobulins tunge kjede, herunder Fc-regioner med naturlig forekommende sekvens og Fc-regionvarianter. Selv om Fc-regionens grenser i et 25 immunglobulins tunge kjede kan variere, er Fc-regionen i det humane IgG-ets tunge kjede vanligvis definert til å strekke seg fra en aminosyreenhet ved posisjon Cys226, eller fra Pro230 til karboksylterminalen derav. Det C-terminale lysinet (enhet 447 ifølge EU-nummereringssystemet) i Fc-regionen kan fjernes for eksempel under produksjon eller rensing av antistoffet, eller ved rekombinant 30 konstruksjon av nukleinsyren som koder for en tung kjede i antistoffet. En sammensetning av intakte antistoffer kan følgelig omfatte antistoffpopulasjoner hvor alle K447-enheter er fjernet, antistoffpopulasjoner hvor ingen K447-enheter er fjernet, og antistoffpopulasjoner som har en blanding av antistoffer med og uten K447-enheten.

En "funksjonell Fc-region" innehar en "effektorfunksjon" for en Fc-region med naturlig forekommende sekvens. Eksempler på "effektorfunksjoner" omfatter C1q-binding, CDC, Fc-reseptorbinding, ADCC, fagocytose, nedregulering av celleoverflatereseptorer (f.eks. B-cellereseptor, BCR) osv. Slike

5 effektorfunksjoner krever alminneligvis at Fc-regionen kombineres med et bindingsdomene (f.eks. et antistoffs variable domene) og kan vurderes ved hjelp av forskjellige assayer som beskrevet for eksempel i definisjonene heri.

En "Fc-region med naturlig forekommende sekvens" omfatter en

10 aminosyresekvens som er identisk med aminosyresekvensen i en Fc-region funnet i naturen. Humane Fc-regioner med naturlig forekommende sekvens omfatter en human IgG1-Fc-region med naturlig forekommende sekvens (ikke-A- og A-allotyper), en human IgG2-Fc-region med naturlig forekommende sekvens, human IgG3-Fc-region med naturlig forekommende sekvens og en

15 human IgG4-Fc-region med naturlig forekommende sekvens samt naturlig forekommende varianter derav.

En "Fc-regionvariant" omfatter en aminosyresekvens som er forskjellig fra den for en Fc-region med naturlig forekommende sekvens, med fortrinnsvis minst én

20 aminosyremodifikasjon, fortrinnsvis én eller flere aminosyresubstitusjoner. Fc-regionvarianten har fortrinnsvis minst én aminosyresubstitusjon sammenlignet med en Fc-region med naturlig forekommende sekvens eller med Fc-regionen i et morpolypeptid, f.eks. fra ca. én til ca. ti aminosyresubstitusjoner og fortrinnsvis fra ca. én til ca. fem aminosyresubstitusjoner i en Fc-region med

25 naturlig forekommende sekvens eller i Fc-regionen i morpolypeptidet. Fc-regionvarianten heri vil fortrinnsvis ha minst ca. 80 % homologi med en Fc-region med naturlig forekommende sekvens og/eller med en Fc-region i et morpolypeptid, og mest foretrukket minst ca. 90 % homologi dermed, mer foretrukket minst ca. 95 % homologi dermed.

30 Med "antistoffavhengig cellemediert cytotoksitet" eller "ADCC" menes en form for cytotoksitet hvor utskilt Ig bundet til Fc-reseptorer (FcR-er) på visse cytotoksiske celler (f.eks. naturlige drapsceller (NK), neutrofiler og makrofager) gjør disse cytotoksiske effektorcellene i stand til å binde spesifikt til en

35 antigenbærende målcelle og deretter drepe målcellen med cytotoksiner. Antistoffene "bevæpner" de cytotoksiske cellene og er absolutt nødvendige for

slik dreping. Primærcellene for mediering av ADCC, NK-celler, uttrykker bare FcγRIII, mens monocytter uttrykker FcγRI, FcγRII og FcγRIII. FcR-ekspressjon på hematopoietiske celler er oppsummert i tabell 3 på side 464 i Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457–92 (1991). For å vurdere ADCC-aktivitet i et

5 molekyl av interesse kan det utføres et ADCC-assay *in vitro*, slik som beskrevet i US-patent nr. 5 500 362 eller 5 821 337. Nyttige effektorceller for slike assayer omfatter mononukleære celler i perifert blod (PBMC) og naturlige drapsceller (NK). ADCC-aktivitet i molekylet av interesse kan eventuelt eller i tillegg vurderes *in vivo*, f.eks. i en dyremodell, slik som den som er beskrevet i Clynes

10 et al. (USA) 95:652–656 (1998).

Med "Fc-reseptor" eller "FcR" menes en reseptor som binder til Fc-regionen i et antistoff. Den foretrukne FcR er en human FcR med naturlig forekommende sekvens. En foretrukket FcR er videre en som binder et IgG-antistoff (en

15 gammareseptor) og omfatter reseptorer av FcγRI-, FcγRII- og FcγRIII- underklassene, herunder alleliske varianter og eventuelt spleisede former av disse reseptorene. FcγRII-reseptorer omfatter FcγRIIA (en "aktiverende reseptor") og FcγRIIB (en "inhiberende reseptor"), som har lignende aminosyresekvenser som er forskjellige primært i de cytoplasmiske domenene

20 derav. Den aktiverende reseptor FcγRIIA inneholder et ITAM (immunoreseptor tyrosine-based activation motif) i sitt cytoplasmiske domene. Den inhiberende reseptor FcγRIIB inneholder et ITIM (immunoreseptor tyrosine-based inhibition motif) i sitt cytoplasmiske domene (se oversikt M. i Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203–234 (1997)). FcR-er behandles i Ravetch and Kinet, Annu.

25 Rev. Immunol. 9:457–492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25–34 (1994) og de Haas et al., J. Lab. Clin. Med, 126:330–41 (1995). Andre FcR-er, herunder dem som vil bli identifisert i fremtiden, omfattes av betegnelsen "FcR" heri. Betegnelsen omfatter også den neonatale reseptoren, FcRn, som er ansvarlig for overføring av morens IgG-er til fosteret (Guyer et al., J. Immunol.

30 117:587 (1976) og Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

Binding til human FcRn *in vivo* og halveringstid i serum av humane polypeptider som binder med høy affinitet for human FcRn, kan analyseres, f.eks. hos transgene mus eller transfekterte humane cellelinjer som uttrykker human FcRn,

35 eller hos primater hvor polypeptidene med en Fc-regionvariant tilføres. WO 2000/42072 (Presta) beskriver antistoffvarianter med forbedret eller redusert

binding til FcR-er. Se også for eksempel Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591–6604 (2001).

"Humane effektorceller" er leukocytter som uttrykker én eller flere FcR-er og utfører effektorfunksjoner. Cellene uttrykker fortrinnsvis minst FcγRIII og utfører ADCC-effektorfunksjoner. Eksempler på humane leukocytter som medierer ADCC, omfatter mononukleære celler i perifert blod (PBMC), naturlige drapsceller (NK), monocytter, cytotoksiske T-celler og neutrofiler, hvor PBMC-er og NK-celler foretrekkes. Effektorcellene kan isoleres fra en naturlig forekommende kilde, f.eks. fra blod.

Med "komplementavhengig cytotoksitet" eller "CDC" menes lysering av en målcelle under nærvær av komplementet. Aktivering av den klassiske komplementledningsveien initieres av den første komponentens binding i komplementsystemet (C1q) til antistoffer (av den relevante underklassen) som er bundet til deres beslektede antigen. For å vurdere komplementaktivering kan det utføres et CDC-assay, f.eks. som beskrevet i Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Polypeptidvarianter med endrede aminosyresekvenser i Fc-regionen (polypeptider med en Fc-regionvariant) og økt eller redusert C1q-bindingsevne er beskrevet, f.eks. i US-patent nr. 6 194 551 B1 og WO 1999/51642. Se også for eksempel Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178–4184 (2000).

Med "Fc-regionomfattende antistoff" menes et antistoff som omfatter en Fc-region. Fc-regionens C-terminale lysin (enhet 447 ifølge EU-nummereringssystemet) kan fjernes for eksempel under rensing av antistoffet eller ved rekombinant konstruksjon av nukleinsyren som koder for antistoffet. En sammensetning omfattende et antistoff med en Fc-region ifølge denne oppfinnelse kan følgelig omfatte et antistoff med K447, med alt K447 fjernet, eller en blanding av antistoffer med og uten K447-enheten.

Med CD79b-polypeptidets "ekstracellulære domene" eller "ECD" menes en form av CD79b-polypeptidet som i det vesentlige er fri for de transmembrane og cytoplasmiske domenene. Et CD79b-polypeptids ECD vil vanligvis ha mindre enn 1 % av slike transmembrane og/eller cytoplasmiske domener og fortrinnsvis ha mindre enn 0,5 % av slike domener. Det er underforstått at alle transmembrane

domener identifisert for CD79b-polypeptidene ifølge den foreliggende oppfinnelse identifiseres i samsvar med kriterier som ofte anvendes i teknikken for identifikasjon av denne typen av hydrofob domene. Et transmembrant domenes nøyaktige grenser kan variere, men sannsynligvis med høyst ca. 5 aminosyrer i

5 hver ende av domenet som innledningsvis identifisert heri. Et ekstracellulært domene i et CD79b-polypeptid kan derfor eventuelt inneholde fra ca. 5 eller færre aminosyrer på hver side av det transmembrane domenets / ekstracellulære domenets grense som identifisert i eksemplene eller patentteksten, og slike polypeptider, med eller uten det assosierte

10 signalpeptidet, og nukleinsyren som koder for dem, omfattes av den foreliggende oppfinnelse.

Den omtrentlige plasseringen av det heri beskrevne CD79b-polypeptidets "signalpeptider" kan angis i den foreliggende patentteksten og/eller på de

15 medfølgende figurene. Det anføres imidlertid at den C-terminale grense for et signalpeptid kan variere, men sannsynligvis med høyst ca. 5 aminosyrer på hver side av signalpeptidets C-terminale grense som innledningsvis identifisert heri, hvor signalpeptidets C-terminale grense kan identifiseres i samsvar med kriteriene som ofte anvendes i teknikken for identifikasjon av denne typen av

20 aminosyresekvensenelement (f.eks. Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) og von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Det er videre anerkjent at spaltingen av en signalsekvens fra et utskilt polypeptid i noen tilfeller ikke er fullstendig ensartet, hvilket resulterer i mer enn én utskilt art. Disse modne polypeptidene, hvor signalpeptidet er spaltet i høyst ca. 5

25 aminosyrer på hver side av den C-terminale grensen av signalpeptidet som identifisert heri, og polynukleotidet som koder for dem, omfattes av den foreliggende oppfinnelse.

Med "CD79b-polypeptidvariant" menes et CD79b-polypeptid, fortrinnsvis et

30 aktivt CD79b-polypeptid, som definert heri til å ha minst ca. 80 % aminosyresekvensidentitet med en CD79b-polypeptidsekvens med naturlig forekommende sekvens av full lengde som beskrevet heri, en CD79b-polypeptidsekvens som mangler signalpeptidet som beskrevet heri, et ekstracellulært domene av et CD79b-polypeptid, med eller uten signalpeptidet,

35 som beskrevet heri eller ethvert annet fragment av en CD79b-polypeptidsekvens av full lengde som beskrevet heri (slik som dem som er kodet av en nukleinsyre

- som representerer bare en del av den fullstendige kodingssekvensen for et CD79b-polypeptid av full lengde). Slike CD79b-polypeptidvarianter omfatter for eksempel CD79b-polypeptider hvor én eller flere aminosyreenheter tilsettes, eller slettes, ved N- eller C-terminalen av den naturlig forekommende aminosyresekvensen av full lengde. En CD79b-polypeptidvariant vil vanligvis ha minst ca. 80 % aminosyresekvensidentitet, eventuelt minst ca. 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % aminosyresekvensidentitet, til en CD79b-polypeptidsekvens med naturlig forekommende sekvens av full lengde som beskrevet heri, en CD79b-polypeptidsekvens som mangler signalpeptidet som beskrevet heri, et ekstracellulært domene av et CD79b-polypeptid, med eller uten signalpeptidet, som beskrevet heri eller ethvert annet spesifikt definert fragment av en CD79b-polypeptidsekvens av full lengde som beskrevet heri. CD79b-polypeptidvarianter er vanligvis minst ca. 10 aminosyrer i lengde, eventuelt minst ca. 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 aminosyrer i lengde, eller mer. CD79b-polypeptidvarianter vil eventuelt ha høyst én konservativ aminosyresubstitusjon sammenlignet med den naturlig forekommende CD79b-polypeptidsekvensen, eventuelt høyst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 konservative aminosyresubstitusjoner sammenlignet med den naturlig forekommende CD79b-polypeptidsekvensen.
- Med "aminosyresekvensidentitet i prosent (%)" med hensyn til et peptid eller en polypeptidsekvens, dvs. CD79b-polypeptidsekvenser som er identifisert heri, menes den prosent av aminosyreenheter i en kandidatsekvens som er identisk med aminosyreenheter i det spesifikke peptidet eller den spesifikke polypeptidsekvensen, dvs. CD79b-polypeptidsekvensen, etter sammenstilling av sekvensene og om nødvendig innføring av tap for å oppnå maksimal prosentvis sekvensidentitet, og uten å ta hensyn til substitusjoner som del av sekvensidentiteten. Sammenstilling for bestemmelse av prosentvis aminosyresekvensidentitet kan oppnås på forskjellige måter som er innenfor teknikken, f.eks. ved hjelp av offentlig tilgjengelig datamaskinprogramvare, slik som programvarene BLAST, BLAST-2, ALIGN eller Megalign (DNASTAR). Fagpersoner kan bestemme egnede parametere for måling av sammenstilling,

herunder alle algoritmer som er nødvendige for å oppnå maksimal sammenstilling over den fulle lengden av sekvensene som sammenlignes. Aminosyresekvensidentitetsverdier i % dannes imidlertid i denne sammenheng ved hjelp av sekvenssammenligningsdataprogrammet ALIGN-2, hvor den

5 fullstendige kildekoden for ALIGN-2-programmet er stilt til rådighet i tabell 1 nedenfor. Sekvenssammenligningsdataprogrammet ALIGN-2 ble utviklet av Genentech, Inc., og kildekoden angitt i tabell 1 nedenfor er inngitt med brukerdokumentasjon ved det amerikanske kontoret for opphavsrett, Washington D.C., 20559, hvor det er registrert under US-registreringsnummer

10 for opphavsrett TXU510087. ALIGN-2-programmet er offentlig tilgjengelig gjennom Genentech, Inc., South San Francisco, California eller kan kompiles fra kildekoden stilt til rådighet i tabell 1 nedenfor. ALIGN-2-programmet bør kompiles for anvendelse på et UNIX-operativsystem, fortrinnsvis digitalt UNIX V4.0D. Alle sekvenssammenligningsparameterne er angitt av ALIGN-2-

15 programmet og kan ikke endres.

I situasjoner hvor ALIGN-2 benyttes for aminosyresekvenssammenligninger, beregnes aminosyresekvensidentiteten i % av en bestemt aminosyresekvens A til, med eller mot en bestemt aminosyresekvens B (som eventuelt kan betegnes

20 som en bestemt aminosyresekvens A som har eller omfatter en viss aminosyresekvensidentitet i % til, med eller mot en bestemt aminosyresekvens B) på følgende måte:

$$100 \text{ ganger brøken } X/Y$$

hvor X er antallet aminosyreenheter angitt som identiske treff av

25 sekvenssammenstillingsprogrammet ALIGN-2 i programmets sammenstilling av A og B, og hvor Y er det samlede antallet aminosyreenheter i B. Det er underforstått at hvis lengden av aminosyresekvens A ikke er lik lengden av aminosyresekvens B, vil ikke aminosyresekvensidentiteten i % av A til B være lik aminosyresekvensidentiteten i % av B til A.

30 Med "CD79b-polynukleotidvariant" eller "CD79b-nukleinsyresekvensvariant" menes et nukleinsyremolekyl som koder for et CD79b-polypeptid, fortrinnsvis et aktivt CD79b-polypeptid, som definert heri og som har minst ca. 80 % nukleinsyresekvensidentitet med en nukleotidsyresekvens som koder for en

35 CD79b-polypeptidsekvens med naturlig forekommende sekvens av full lengde som beskrevet heri, en CD79b-polypeptidsekvens med naturlig forekommende

sekvens av full lengde som mangler signalpeptidet som beskrevet heri, et ekstracellulært domene i et CD79b-polypeptid, med eller uten signalpeptidet, som beskrevet heri eller ethvert annet spesifikt definert fragment av en CD79b-polypeptidsekvens av full lengde som beskrevet heri (slik som dem som er kodet av en nukleinsyre som representerer bare en del av den fullstendige kodingssekvensen for et CD79b-polypeptid av full lengde). En CD79b-polynukleotidvariant vil vanligvis ha minst ca. 80 % nukleinsyresekvensidentitet, eventuelt minst ca. 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % nukleinsyresekvensidentitet med en nukleinsyresekvens som koder for en CD79b-polypeptidsekvens med naturlig forekommende sekvens av full lengde som beskrevet heri, en CD79b-polypeptidsekvens som mangler signalpeptidet som beskrevet heri, et ekstracellulært domene i et CD79b-polypeptid, med eller uten signalpeptidet, som beskrevet heri eller ethvert annet spesifikt definert fragment av en CD79b-polypeptidsekvens av full lengde som beskrevet heri. Varianter omfatter ikke den naturlige forekommende nukleotidsekvensen.

CD79b-polynukleotidvarianter er vanligvis minst ca. 5 nukleotider i lengde, eventuelt minst ca. 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, eller 1000 nukleotider i lengde, hvor det i denne sammenheng med "ca." menes den omtalte nukleotidsekvenslengden pluss eller minus 10 % av den omtalte lengde.

30

Med "nukleinsyresekvensidentitet i %" med hensyn til CD79b som koder for nukleinsyresekvenser som er identifisert heri, menes prosenten av nukleotider i en kandidatsekvens som er identisk med nukleotidene i CD79b-nukleinsyresekvensen av interesse, etter sammenstilling av sekvensene og om nødvendig innføring av tap for å oppnå den maksimale prosentvise sekvensidentiteten. Sammenstilling for bestemmelse av prosentvis

35

nukleinsyresekvensidentitet kan oppnås på forskjellige måter som er innenfor teknikken, f.eks. ved hjelp av offentlig tilgjengelig datamaskinprogramvare, slik som programvarene BLAST, BLAST-2, ALIGN eller Megalign (DNASTAR). Nukleinsyresekvensidentitetsverdier i % dannes imidlertid i denne sammenheng

5 ved hjelp av sekvenssammenligningsdataprogrammet ALIGN-2, hvor den fullstendige kildekoden for ALIGN-2-programmet er stilt til rådighet i tabell 1 nedenfor. Sekvenssammenligningsdataprogrammet ALIGN-2 ble utviklet av Genentech, Inc., og kildekoden angitt i tabell 1 nedenfor er inngitt med brukerdokumentasjon ved det amerikanske kontoret for opphavsrett,

10 Washington D.G., 20559, hvor det er registrert under US-registreringsnummer for opphavsrett TXU510087. ALIGN-2-programmet er offentlig tilgjengelig gjennom Genentech, Inc., South San Francisco, California eller kan kompileres fra kildekoden stilt til rådighet i tabell 1 nedenfor. ALIGN-2-programmet bør kompileres for anvendelse på et UNIX-operativsystem, fortrinnsvis digitalt UNIX

15 V4.0D. Alle sekvenssammenligningsparameterne er angitt av ALIGN-2-programmet og kan ikke endres.

I situasjoner hvor ALIGN-2 benyttes til nukleinsyresekvenssammenligninger, beregnes nukleinsyresekvensidentiteten i % av en bestemt nukleinsyresekvens C

20 til, med eller mot en bestemt nukleinsyresekvens D (som eventuelt kan betegnes som en bestemt nukleinsyresekvens C som har eller omfatter en viss nukleinsyresekvensidentitet i % til, med eller mot en bestemt nukleinsyresekvens D) på følgende måte:

$$100 \text{ ganger brøken } W/Z$$

25 hvor W er antallet nukleotider angitt som identiske treff av sekvenssammenstillingsprogrammet ALIGN-2 i programmets sammenstilling av C og D, og hvor Z er det samlede antallet nukleotider i D. Det er underforstått at hvis lengden av nukleinsyresekvens C ikke er lik lengden av nukleinsyresekvens D, vil ikke nukleinsyresekvensidentiteten i % av C til D være lik

30 nukleinsyresekvensidentiteten i % av D til C. Med mindre annet er særlig angitt, er alle heri anvendte nukleinsyresekvensidentitetsverdier i % oppnådd som beskrevet i det umiddelbart foregående avsnitt ved hjelp av ALIGN-2-dataprogrammet.

35 I andre utførelsesformer er CD79b-polynukleotidvarianter nukleinsyremolekyler som koder for et CD79b-polypeptid, og som kan hybridisere, fortrinnsvis under

strenge hybridiserings- og skylleforhold, til nukleotidsekvenser som koder for et CD79b-polypeptid av full lengde som beskrevet heri. CD79b-polypeptidvarianter kan være dem som er kodet av en CD79b-polynukleotidvariant.

- 5 Med "kodingsregion av full lengde" som anvendt om en nukleinsyre som koder for et CD79b-polypeptid, menes sekvensen av nukleotider som koder for CD79b-polypeptidet av full lengde ifølge oppfinnelsen (som ofte er angitt mellom start- og stoppkodoner, inklusive derav, på de medfølgende figurene). Med "kodingsregion av full lengde" som anvendt om en ATCC-segmentert nukleinsyre
10 menes CD79b-polypeptidet som koder for en del av cDNA-et som er innsatt i vektoren deponert hos ATCC (som ofte er angitt mellom start- og stoppkodoner, inklusive derav, på de medfølgende figurene (start- og stoppkodoner er uthevet og understreket på figurene)).
- 15 Med "isolert" som anvendt til å beskrive de forskjellige heri beskrevne CD79b-polypeptidene menes polypeptid som er identifisert og separert og/eller utvunnet fra en komponent i sitt naturlige miljø. Urene komponenter i sitt naturlige miljø er materialer som typisk ville forstyrre terapeutiske anvendelser for polypeptidet, og kan omfatte enzymer, hormoner og andre proteinholdige eller ikke-
20 proteinholdige soluter. I foretrukne utførelsesformer vil polypeptidet renses 1) til en tilstrekkelig grad for å oppnå minst 15 enheter av N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av sekvenator med roterende kopp eller 2) til homogenitet ved SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende forhold ved hjelp av coomassieblå eller fortrinnsvis sølvfarge. Isolert polypeptid omfatter
25 polypeptid *in situ* i rekombinante celler siden minst én komponent i CD79b-polypeptidets naturlige miljø ikke vil være til stede. Isolert polypeptid vil imidlertid vanligvis bli fremstilt ved minst ett rensetrinn.

- 30 En "isolert" CD79b-polypeptidkodende nukleinsyre eller andre polypeptidkodende nukleinsyrer er et nukleinsyremolekyl som identifiseres og separeres fra minst ett forurensende nukleinsyremolekyl hvormed det vanligvis er assosiert i den polypeptidkodende nukleinsyrens naturlige kilde. Et isolert polypeptidkodende nukleinsyremolekyl er annet enn i den form eller de omgivelser hvor det finnes i naturen. Isolerte polypeptidkodende nukleinsyremolekyler er derfor forskjellige
35 fra det spesifikke polypeptidkodende nukleinsyremolekylet siden det finnes i naturlige celler. Men et isolert polypeptidkodende nukleinsyremolekyl omfatter

polypeptidkodende nukleinsyremolekyler i celler som vanligvis uttrykker polypeptidet hvor for eksempel nukleinsyremolekylet er i en annen kromosomplassering som er forskjellig fra den for naturlige celler.

- 5 Med "kontrollsekvenser" menes DNA-sekvenser som er nødvendige for ekspresjonen av en operativt bundet kodingssekvens i en særlig vertsorganisme. Kontrollsekvensene som for eksempel er egnet til prokaryoter, omfatter en promotor, eventuelt en operatorsekvens, og et ribosombindingssted. Eukaryotiske celler er kjent for å anvende promotore og
10 polyadenyleringssignaler.

Nukleinsyre er "operativt bundet" når det er plassert i et funksjonelt forhold med en annen nukleinsyresekvens. DNA for en presekvens eller sekretorisk leder er for eksempel operativt bundet til DNA for et polypeptid hvis det er uttrykt som et
15 preprotein som deltar i utskilling av polypeptidet; en promotor er operativt bundet til en kodingssekvens hvis den påvirker transkripsjonen av sekvensen, eller et ribosombindingssted er operativt bundet til en kodingssekvens hvis det er plassert for å lette translasjon. Med "operativt bundet" menes alminneligvis at DNA-sekvensene som er bundet, er tilstøtende og for en sekretorisk leder
20 tilstøtende og i lesefase. Enhancere behøver imidlertid ikke å være tilstøtende. Binding oppnås ved ligering på praktiske restriksjonssteder. Hvis slike steder ikke finnes, anvendes de syntetiske oligonukleotidadapterne eller -linkerne i samsvar med klassisk praksis.

- 25 "Strengthet" for hybridiseringsreaksjoner bestemmes enkelt av en alminnelig fagperson og er vanligvis en empirisk beregning avhengig av sondelengde, skylletemperatur og saltkonsentrasjon. Lengre sonder krever vanligvis høyere temperaturer for riktig annealing, mens kortere sonder krever lavere temperaturer. Hybridisering avhenger vanligvis av denaturert DNAs evne til å
30 reanneale når komplementære tråder finnes i et miljø under deres smeltetemperatur. Jo høyere grad av ønsket homologi mellom sonden og den hybridiserbare sekvensen, desto høyere er den relative temperaturen som kan anvendes. Det følger derfor at høyere relative temperaturer ville ha en tendens til å gjøre reaksjonsbetingelsene strengere, mens lavere temperaturer gjør dem
35 mindre strenge. Mer informasjon og forklaring av strengthet for

hybridiseringsreaksjoner finnes i Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Strenge betingelser" eller "betingelser med høy strenghet" kan som definert
 5 heri identifiseres av dem som: 1) anvender lav ionisk styrke og høy temperatur
 til skylling, f.eks. 0,015 M natriumklorid / 0,0015 M natriumsitrat / 0,1 %
 natriumdodekylsulfat ved 50 °C, 2) anvender et denatureringsstoff under
 hybridisering, slik som formamid, f.eks. 50 vekt-% formamid med 0,1 % bovint
 serumalbumin / 0,1 % Ficoll / 0,1 % polyvinylpyrrolidon / 50 mM
 10 natriumfosfatbuffer ved pH 6,5 med 750 mM natriumklorid, 75 mM natriumsitrat
 ved 42 °C, eller 3) hybridisering over natten i en løsning som anvender 50 %
 formamid, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M natriumsitrat), 50 mM natriumfosfat
 (pH 6,8), 0,1 % natriumpyrofosfat, 5 x Denhardts løsning, ultralydbehandlet
 laksesperm-DNA (50 µg/ml), 0,1 % SDS og 10 % dekstransulfat ved 42 °C, med
 15 en 10 minutters skylling ved 42 °C i 0,2 x SSC (natriumklorid/natriumsitrat)
 etterfulgt av 10 minutters skylling med høy strenghet bestående av 0,1 x SSC
 inneholdende EDTA ved 55 °C.

"Moderat strenge betingelser" kan identifiseres som beskrevet av Sambrook et
 20 al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor
 Press, 1989, og omfatte anvendelse av skylleløsning og hybridiseringsbetingelser
 (f.eks. temperatur, ionisk styrke og % SDS) som er mindre strenge enn dem
 som er beskrevet ovenfor. Et eksempel på moderat strenge betingelser er
 inkubasjon over natten ved 37 °C i en løsning omfattende: 20 % formamid,
 25 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trinatriumcitrat), 50 mM natriumfosfat (pH 7,6),
 5 x Denhardts løsning, 10 % dekstransulfat og 20 mg/ml denaturert skåret
 laksesperm-DNA, etterfulgt av skylling av filtrene i 1 x SSC ved ca. 37–50 °C.
 Fagpersonen vil gjenkjenne hvordan han skal justere temperaturen, den ioniske
 styrken osv. som nødvendig for å ta hensyn til faktorer slik som sondelengde og
 30 lignende.

Med "epitopmerket" menes som anvendt heri et kimært polypeptid omfattende
 et CD79b-polypeptid eller anti-CD79b-antistoff fusjonert til et
 "markørpolypeptid". Markørpolypeptidet har enheter nok til å gi en epitop mot
 35 hvilken et antistoff kan fremstilles, men er kort nok til at det ikke forstyrrer
 aktiviteten til polypeptidet hvortil det er fusjonert. Markørpolypeptidet er også

fortrinnsvis ganske unikt, slik at antistoffet i det vesentlige ikke kryssreagerer med andre epitoper. Egnede markørpolypeptider har vanligvis minst seks aminosyreenheter og vanligvis mellom ca. 8 og 50 aminosyreenheter (fortrinnsvis mellom ca. 10 og 20 aminosyreenheter).

5

Med "aktiv" eller "aktivitet" menes i denne sammenheng former av et CD79b-polypeptid som beholder en biologisk og/eller en immunologisk aktivitet av naturlig forekommende CD79b, hvor det med "biologisk" aktivitet menes en annen biologisk funksjon (enten inhiberende eller stimulerende) forårsaket av et naturlig forekommende CD79b enn evnen til å indusere produksjon av et antistoff mot en antigenepitop av et naturlig forekommende CD79b, og med "immunologisk" aktivitet menes evnen til å indusere produksjon av et antistoff mot en antigenepitop av et naturlig forekommende CD79b.

15 Betegnelsen "antagonist" anvendes i videste forstand og omfatter alle molekyler som delvis eller fullstendig blokkerer, inhiberer eller nøytraliserer et naturlig forekommende CD79b-polypeptids biologisk aktivitet. Betegnelsen "agonist" anvendes likeledes i videste forstand og omfatter alle molekyler som kopierer en biologisk aktivitet hos et naturlig forekommende CD79b-polypeptid. Egnede agonist- eller antagonistmolekyler omfatter spesifikt agonist- eller antagonistantistoffer eller antistofffragmenter, fragmenter eller aminosyresekvensvarianter av naturlig forekommende CD79b-polypeptider, peptider, antisensoligonukleotider, små organiske molekyler osv. Fremgangsmåter for identifikasjon av agonister eller antagonister av et CD79b-polypeptid kan omfatte opprettelse av kontakt mellom et CD79b-polypeptid og en kandidatagonist eller et antagonistmolekyl og måling av en påvisbar endring i én eller flere biologiske aktiviteter som vanligvis er assosiert med CD79b-polypeptidet.

30 Med "renset" menes at et molekyl finnes i en prøve ved en konsentrasjon på minst 95 vekt-%, eller minst 98 vekt-% av prøven hvori det finnes.

Et "isolert" nukleinsyremolekyl er et nukleinsyremolekyl som er separert fra minst ett annet nukleinsyremolekyl hvormed det vanligvis er assosiert, f.eks. i sitt naturlige miljø. Et isolert nukleinsyremolekyl omfatter videre et nukleinsyremolekyl i celler som vanligvis uttrykker nukleinsyremolekylet, men

35

nukleinsyremolekylet finnes ekstrakromosomalt eller ved en kromosomal plassering som er forskjellig fra dets naturlige kromosomale plassering.

Med "vektor" menes som anvendt heri et nukleinsyremolekyl som kan transportere en annen nukleinsyre hvortil den er bundet. Én vektortype er et "plasmid", hvilket vil si en sirkelformet dobbelttrådet DNA-sløyfe hvortil ytterligere DNA-segmenter kan være ligert. En annen vektortype er en fagvektor. En annen vektortype er en viral vektor, hvor ytterligere DNA-segmenter kan være ligert i viralgenomet. Visse vektorer kan utføre autonom replikasjon i en vertscelle hvortil de tilføres (f.eks. bakterievektorer med et bakterielt replikasjonsorigin og episomale pattedyrvektorer). Andre vektorer (f.eks. ikke-episomale pattedyrvektorer) kan integreres i genomet av en vertscelle ved tilførsel til vertscellen og derved replikeres sammen med vertsgenomet. Visse vektorer kan videre styre ekspresjonen av genene hvortil de er operativt bundet. Slike vektorer betegnes heri "rekombinante ekspresjonsvektorer" (eller bare "rekombinante vektorer"). Ekspresjonsvektorer for anvendelse i rekombinante DNA-teknikker er alminneligvis i form av plasmider. I den foreliggende patentteksten kan "plasmid" og "vektor" være anvendt om hverandre, siden plasmid er den mest vanlig anvendte formen for vektor.

Med "polynukleotid" eller "nukleinsyre" menes som anvendt om hverandre heri polymerer av nukleotider av alle lengder og omfatter DNA og RNA. Nukleotidene kan være deoksyribonukleotider, ribonukleotider, modifiserte nukleotider eller baser og/eller deres analoger, eller alle substrater som kan inkorporeres i en polymer ved DNA- eller RNA-polymerase, eller ved en syntetisk reaksjon. Et polynukleotid kan omfatte modifiserte nukleotider, slik som metylerte nukleotider og deres analoger. Eventuell modifikasjon av nukleotidstrukturen kan overføres før eller etter sammenstilling av polymeren. Sekvensen av nukleotider kan avbrytes av ikke-nukleotidkomponenter. Et polynukleotid kan modifiseres ytterligere etter syntese, slik som ved konjugering med en markør. Andre modifikasjonstyper omfatter for eksempel "kapsler", substitusjon av én eller flere av de naturlig forekommende nukleotidene med en analog, internukleotidmodifikasjoner slik som for eksempel dem med uladde bindinger (f.eks. metylfosfonater, fosfotriester, fosfoamidater, karbamater osv.) og med ladde bindinger (f.eks. fosfortioater, fosforditioater osv.), dem som inneholder

pendantenheter, slik som for eksempel proteiner (f.eks. nukleaser, toksiner, antistoffer, signalpeptider, ply-L-lysin osv.), dem med interkalatorer (f.eks. akridin, psoralen osv.), dem som inneholder chelatorer (f.eks. metaller, radioaktive metaller, bor, oksidative metaller osv.), dem som inneholder

5 alkylatorer, dem med modifiserte bindinger (f.eks. alfaanomeriske nukleinsyrer osv.) samt umodifiserte former av polynukleotidene. En hvilken som helst av hydroksylgruppene som vanligvis finnes i sukrene, kan videre utbyttes med for eksempel fosfonatgrupper, fosfatgrupper, beskyttet av alminnelige beskyttelsesgrupper, eller aktivert for å fremstille ytterligere bindinger til

10 ytterligere nukleotider, eller kan konjugeres til faste eller halvfaste faser. Det 5'- og 3'-terminale OH kan fosforyleres eller substitueres med aminer eller organiske kapslende gruppenheter med fra 1 til 20 karbonatomer. Andre hydroksyler kan også avledes til alminnelige beskyttelsesgrupper. Polynukleotider kan også inneholde analoge former av ribose- eller

15 deoksyribosesukre som er generelt kjent i teknikken, herunder for eksempel 2'-O-metyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluor- eller 2'-azidoribose, karbosykliske sukkeranaloger, alfaanomeriske sukre, epimeriske sukre slik som arabinose, xyloser eller lyksoser, pyranosesukre, furanosesukre, sedoheptuloser, asykliske analoger og abasiske nukleosidanaloger slik som metylribosid. Én eller flere

20 fosfodiesterbindinger kan utbyttes med alternative bindingsgrupper. Disse alternative bindingsgruppene omfatter blant annet utførelsesformer hvor fosfat er utbyttet med P(O)S("tioat"), P(S)S ("ditioat"), "(O)NR.sub.2 ("amidat"), P(O)R, P(O)OR', CO eller CH.sub.2 ("formacetal"), hvor R eller R' i hvert tilfelle uavhengig er H eller substituert eller usubstituert alkyl (1-20 C.), eventuelt

25 inneholdende en eter(-O-)-binding, aryl, alkenyl, sykloalkyl, sykloalkenyl eller araldyl. Ikke alle bindinger i et polynukleotid må være identiske. Foregående beskrivelse gjelder alle heri omtalte polynukleotider, herunder RNA og DNA.

Med "oligonukleotid" menes som anvendt heri generelt korte, generelt

30 enkelttrådede, generelt syntetiske polynukleotider som alminneligvis, men ikke nødvendigvis, er mindre enn ca. 200 nukleotider i lengde. Betegnelsene "oligonukleotid" og "polynukleotid" er ikke gjensidig utelukkende. Beskrivelsen ovenfor for polynukleotider er likeledes og helt anvendelig for oligonukleotider.

35 Med "kreft" og "kreftfremkallende" menes den fysiologiske tilstanden hos pattedyr som typisk karakteriseres ved uregulert cellevekst. Eksempler på kreft

omfatter blant annet hematopoietisk kreft eller blodrelatert kreft, slik som lymfom, leukemi, myelom eller lymfoidondartetheter, men også kreft i milten og kreft i lymfeknuter og også karsinom, blastom og sarkom. Mer særlige eksempler på kreft omfatter B-celleassosiert kreft, herunder for eksempel høy-,
5 mellom- og lavgradige lymfomer (omfattende B-cellelymfomer slik som for eksempel slimhinneassosiert lymfoidvev-B-cellelymfom og non-Hodgkins-lymfom (NHL), mantelcellelymfom, Burkitts lymfom, småcellet lymfatisk lymfom, marginalsonelymfom, diffust storcellet lymfom, follikulært lymfom og Hodgkins-lymfom og T-cellelymfomer) og leukemier (omfattende sekundærleukemi,
10 kronisk lymfatisk leukemi (CLL), slik som B-celleleukemi (CD5+ B-lymfocytter), myeloidleukemi, slik som akutt myeloidleukemi, kronisk myeloidleukemi, lymfoidleukemi, slik som akutt lymfoblastisk leukemi (ALL) og myelodysplasi) og andre hematologisk og/eller B-celle- eller T-celleassosiert kreft. Også omfattet er kreft i ytterligere hematopoietiske celler, herunder polymorfonukleære
15 leukocytter, slik som basofiler, eosinofiler, neutrofiler og monocytter, dendritiske celler, blodplater, erytrocytter og naturlige drapsceller. Også omfattet er kreftfremkallende B-celleproliferative forstyrrelser valgt fra følgende: lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk
20 lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom. Opprinnelsen for B-cellekreft omfatter som følger: marginalsone-B-cellelymfom har sin opprinnelse i B-celler i marginalsone, follikulært lymfom og diffust storcellet B-cellelymfom har sin opprinnelse i sentrocytter i den lette sonen av germinale sentre, kronisk
25 lymfatisk leukemi og småcellet lymfatisk leukemi har sin opprinnelse i B1-celler (CD5+), mantelcellelymfom har sin opprinnelse i naive B-celler i mantelsonen, og Burkitts lymfom har sin opprinnelse i sentroblasten i den mørke sonen av germinale sentre. Vev som omfatter hematopoietiske celler, heri betegnet "hematopoietisk cellevev", omfatter thymus og benmarg og perifere lymfoidvev,
30 slik som milt, lymfeknuter, lymfoidvev assosiert med slimhinner, slik som tarmassosiert lymfoidvev, mandler, Peyers plakk og blindtarm og lymfoidvev assosiert med andre slimhinner, f.eks. bronkiale epitler. Ytterligere særlige eksempler på slik kreft omfatter skvamøs celledreft, småcellet lungekreft, ikke-småcellet lungekreft, adenokarsinom i lungen, skvamøst karsinom i lungen, kreft i
35 bukhinnen, hepatocellulær kreft, gastrointestinal kreft, kreft i bukspyttkjertelen, gliom, livmorhalskreft, eggstokkreft, leverkreft, blærekreft, hepatom, brystkreft,

tykktarmskreft, kolorektalkreft, endometrial- eller uterinkarsinom, spyttkjertelkarsinom, nyrekreft, leverkreft, prostatakreft, vulvakreft, tyroidkreft, hepatisk karsinom, leukemi og andre lymfoproliferative forstyrrelser og forskjellige typer av hode- og halskreft.

5

En "B-celleondartethet" omfatter heri non-Hodgkins-lymfom (NHL), herunder lavgradig/follikulært NHL, småcellet lymfatisk (SL) NHL, mellomgradig/follikulært NHL, mellomgradig diffust NHL, høygradig immunoblastisk NHL, høygradig lymfoblastisk NHL, høygradig småcellet ikke-spaltet celle-NHL, bulky sykdom-
 10 NHL, mantelcellelymfom, AIDS-relatert lymfom og Waldenströms makroglobulinemi, non-Hodgkins-lymfom (NHL), lymfocyttpredominant Hodgkins-sykdom (LPHD), småcellet lymfatisk lymfom (SLL), kronisk lymfatisk leukemi (CLL), indolent NHL omfattende residivert indolent NHL og rituksimab-refraktært indolent NHL, leukemi, herunder akutt lymfoblastisk leukemi (ALL),
 15 kronisk lymfatisk leukemi (CLL), hårcelleleukemi, kronisk myeloblastisk leukemi, mantelcellelymfom og andre hematologiske ondartetheter. Slike ondartetheter kan behandles med antistoffer direkte mot B-celleoverflatemarkører, slik som CD79b. Slike sykdommer tenkes heri behandlet ved tilførsel av et antistoff direkte mot en B-celleoverflatemarkør, slik som CD79b, og omfatter tilførsel av
 20 et ukonjugert ("nakent") antistoff eller et antistoff konjugert til et cytotoksisk stoff som beskrevet heri. Slike sykdommer tenkes også heri behandlet ved kombinasjonsbehandling omfattende et anti-CD79b-antistoff eller anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugat ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med et annet antistoff eller antistofflegemiddelkonjugat, et annen cytotoksisk stoff, stråling eller
 25 annen behandling tilført samtidig eller i serie. I eksempelet på behandlingsmåte ifølge oppfinnelsen tilføres et anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med et anti-CD20-antistoff, immunglobulin eller CD20-bindingsfragment derav, enten i fellesskap eller sekvensielt. Anti-CD20-antistoffet kan være et nakent antistoff eller et antistofflegemiddelkonjugat. I en
 30 utførelsesform for kombinasjonsbehandlingen er anti-CD79b-antistoff et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse, og anti-CD20-antistoffet er Rituxan® (rituximab).

Med "non-Hodgkins-lymfom" eller "NHL" menes som anvendt heri annen kreft i
 35 lymfesystemet enn Hodgkins-lymfomer. Hodgkins-lymfomer kan vanligvis skilles fra non-Hodgkins-lymfomer under nærvær av Reed-Sternberg-celler i Hodgkins-

lymfomer og fravær av nevnte celler i non-Hodgkins-lymfomer. Eksempler på non-Hodgkins-lymfomer omfattet av betegnelsen som anvendt heri omfatter ethvert som ville bli identifisert som sådant av en fagperson (f.eks. en onkolog eller patolog) i samsvar med klassifiseringsskjemaer som er kjent i teknikken, slik som REAL-skjemaet (Revised European-American Lymphoma) som beskrevet i Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Se spesielt listene på fig. 11.57, 11.58 og 11.59. Mer spesifikke eksempler omfatter blant annet residivert eller refraktært NHL, lavgradig frontlinje-NHL, stadie III/IV-NHL, kjemoterapiresistant NHL, lymfoblastisk forløper B-leukemi og/eller -lymfom, småcellet lymfatisk lymfom, kronisk lymfatisk B-celleleukemi og/eller prolymfatisk leukemi og/eller småcellet lymfatisk lymfom, prolymfatisk B-cellelymfom, immuncytom og/eller lymfoplasmacyttisk lymfom, lymfoplasmacyttisk lymfom, marginalsone-B-cellelymfom, miltmarginalsone-lymfom, ekstranodalt marginalsone-MALT-lymfom, nodalt marginalsone-lymfom, hårccelleleukemi, plasmacytom og/eller plasmacellemyelom, lavgradig/follikulært lymfom, mellomgradig/follikulært NHL, mantelcellelymfom, hårsekk-senterlymfom (follikulær), mellomgradig diffust NHL, diffust storcellet B-cellelymfom, aggressivt NHL (omfattende aggressivt frontlinje-NHL og aggressivt residivert NHL), NHL residiverende etter eller refraktært til autolog stamcelletransplantasjon, primært mediastinalt storcellet B-cellelymfom, primært effusjonslymfom, høygradig immunoblastisk NHL, høygradig lymfoblastisk NHL, høygradig småcellet ikke-spaltet celle-NHL, bulky sykdom-NHL, Burkitts lymfom, (perifert) storcellet granulært lymfatisk leukemi, mycosis fungoides og/eller Sezarys syndrom, hudlymfomer (kutane lymfomer), anaplastisk storcellet lymfom, angiosentrisk lymfom.

En "forstyrrelse" er enhver tilstand som vil dra fordel av behandling med et stoff/molekyl eller en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen. Dette omfatter kroniske og akutte forstyrrelser eller sykdommer omfattende de patologiske tilstander som predisponerer pattedyret for den aktuelle forstyrrelsen. Ikke-begrensede eksempler på forstyrrelser som skal behandles heri, omfatter krefttilstander slik som ondartede og godartede tumorer, ikke-leukemier og lymfoidondartetheter, neuronale, gliale, astrocytale, hypotalamiske og andre glandulære, makrofage, epiteliale, stromale og blastocoeliske forstyrrelser og inflammatoriske, immunologiske og andre angiogeneserelaterte forstyrrelser.

Forstyrrelser omfatter videre krefttilstander slik som B-celleproliferative forstyrrelser og/eller B-celletumorer, f.eks. lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL),
5 småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

Med "celleproliferativ forstyrrelse" og "proliferativ forstyrrelse" menes forstyrrelser som er forbundet med en grad av unormal celleproliferasjon. I en
10 utførelsesform er den celleproliferative forstyrrelsen kreft.

Med "tumor" menes som anvendt heri all neoplastisk cellevekst og proliferasjon, enten den er ondartet eller godartet, og alle pre-kreft- og kreftfremkallende celler og vev.

15

Med "autoimmun sykdom" menes heri en sykdom eller forstyrrelse som oppstår fra og er rettet mot en persons eget vev eller egne organer eller et kosegregat eller en manifestasjon derav eller en resulterende tilstand derav. I mange av disse autoimmune og inflammatoriske forstyrrelsene kan det forekomme en
20 rekke kliniske markører og laboratoriemarkører, herunder blant annet hypergammaglobulinemi, høye nivåer av autoantistoffer, antigen/antistoffkompleksavsetninger i vev, fordel fra kortikosteroide eller immunsuppressive behandlinger, og lymfoidcelleaggregater i berørt vev. Uten å være begrenset til noen teori med hensyn til B-cellemediert autoimmun sykdom antas det at B-
25 celler viser en patogen virkning i humane autoimmune sykdommer gjennom en rekke mekanistiske ledningsveier, herunder autoantistoffproduksjon, immunkompleksdannelse, dendrittisk aktivering og T-celleaktivering, cytokinsynteser, direkte kjemokinfrisetting og tilveiebringelse av et nidus for ektopisk neo-lymfogenese. Hver av disse ledningsveiene kan delta i forskjellig
30 grad i patologien til autoimmune sykdommer.

"Autoimmun sykdom" kan være en organspesifikk sykdom (dvs. immunresponsen er spesifikt rettet mot et organsystem slik som det endokrine systemet, det hematopoietiske systemet, huden, det kardiopulmonære
35 systemet, det gastrointestinale systemet og leversystemet, nyresystemet, thyroide, ørene, det neuromuskulære systemet, sentralnervesystemet osv.) eller

en systemisk sykdom som kan påvirke flere organsystemer (f.eks. systemisk lupus erythematosus (SLE), revmatoid artritt, polymyositt osv.). Foretrukne slike sykdommer omfatter autoimmune revmatologiske forstyrrelser (slik som for eksempel revmatoid artritt, Sjögrens syndrom, skleroderma, lupus slik som SLE og lupus nefritt, polymyositt/dermatomyositt, kryoglobulinemi, anti-fosfolipid-antistoffsyndrom og psoriasisartritt), autoimmune gastrointestinale forstyrrelser og leverforstyrrelser (slik som for eksempel inflammatoriske tarmsykdommer (f.eks. ulcerøs kolitt og Crohns sykdom), autoimmun gastritt og pernisiøs anemi, autoimmun hepatitt, primær biliær cirrhose, primær skleroserende kolangitt og cøliaki), vaskulitt (slik som for eksempel ANCA-negativ vaskulitt og ANCA-assosiert vaskulitt, herunder Churg-Strauss-vaskulitt, Wegeners granulomatose og mikroskopisk polyangitt), autoimmune neurologiske forstyrrelser (slik som for eksempel multippel sklerose, opsoklonus-myoklonussyndrom, myasthenia gravis, neuromyelitis optica, Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom og autoimmune polyneuropatier), nyreforstyrrelser (slik som for eksempel glomerulonefritt, Goodpastures syndrom og Bergers sykdom), autoimmune dermatologiske forstyrrelser (slik som for eksempel psoriasis, elveblest, neslefeber, pemfigus vulgaris, bulløs pemfigus og kutan lupus erythematosus), hematologiske forstyrrelser (slik som for eksempel trombocytopen purpura, trombotisk trombocytopen purpura, post-transfusjonpurpura og autoimmun hemolytisk anemi), aterosklerose, uvetitt, autoimmune hørselssykdommer (slik som for eksempel indre øresykdom og hørselstap) og Behcets sykdom, Raynauds syndrom, organtransplantasjon og autoimmune endokrine forstyrrelser (slik som for eksempel diabetesrelaterte autoimmune sykdommer slik som insulinavhengig diabetes mellitus (IDDM), Addisons sykdom og autoimmun thyroidsykdom (f.eks. Graves sykdom og tyroiditt)). Slike sykdommer omfatter for eksempel mer foretrukket revmatoid artritt, ulcerøs kolitt, ANCA-assosiert vaskulitt, lupus, multippel sklerose, Sjögrens syndrom, Graves sykdom, IDDM, pernisiøs anemi, tyreoiditt og glomerulonefritt.

30

Spesifikke eksempler på andre autoimmune sykdommer som definert heri, som i noen tilfeller omfatter dem angitt ovenfor, omfatter blant annet artritt (akutt og kronisk, revmatoid artritt omfattende revmatoid artritt med juvenil debut og faser slik som revmatoid synovitt, gikt eller giktisk artritt, akutt immunologisk artritt, kronisk inflammatorisk artritt, degenerativ artritt, type II-kollagenindusert artritt, infeksiøs artritt, Lyme-artritt, proliferativ artritt,

35

psoriasisartritt, Stills sykdom, vertebral artritt, osteoartritt, arthritis chronica progrediente, arthritis deformans, polyarthritis chronica primaria, reaktiv artritt, menopausal artritt, østrogendeplelesjonsartritt og ankyloserende spondylitt / reumatoid spondylitt), autoimmun lymfoproliferativ sykdom,

5 inflammatoriske hyperproliferative hudsykdommer, psoriasis slik som plakkpsoriasis, dråpepsoriasis, pustular psoriasis, og neglepsoriasis, atopi omfattende atopiske sykdommer slik som høysnue og Jobs syndrom, dermatitt omfattende kontaktdermatitt, kronisk kontaktdermatitt, eksfoliativ dermatitt, allergisk dermatitt, allergisk kontaktdermatitt, neslefeber, herpetiform dermatitt,

10 nummular dermatitt, melkeutslett, ikke-spesifikk dermatitt, primær irriterende kontaktdermatitt og atopisk dermatitt, x-bundet hyper-IgM-syndrom, allergiske intraokulære inflammatoriske sykdommer, elveblest slik som kronisk allergisk elvebelst og kronisk idiopatisk elveblest, herunder kronisk autoimmun elveblest, myositt, polymyositt/dermatomyositt, juvenil dermatomyositt, toksisk epidermal

15 nekrolyse, skleroderma (omfattende systemisk sklerodema), sklerose slik som systemisk sklerose, multippel sklerose (MS) slik som spino-optisk MS, primær progressiv MS (PPMS) og residiverende remitterende MS (RRMS), progressiv systemisk sklerose, aterosklerose, arteriosklerose, sclerosis disseminata, ataksisk sklerose, neuromyelitis optica (NMO), inflammatorisk tarmsykdom (IBD)

20 (f.eks. Crohns sykdom, autoimmunmedierte gastrointestinale sykdommer, gastrointestinal inflammasjon, kolitt slik som ulcerøs kolitt, colitis ulcerosa, mikroskopisk kolitt, kollagenkolitt, colitis polyposa, nekrotiserende enterokolitt og transmural kolitt og autoimmun inflammatorisk tarmsykdom), tarminflammasjon, pyoderma gangrenosum, erythema nodosum, primær

25 skleroserende kolangitt, respiratorisk distressyndrom, herunder adult eller akutt respiratorisk distressyndrom (ARDS), meningitt, inflammasjon av hele eller deler av uvea, iritt, koroiditt, en autoimmun hematologisk forstyrrelse, transplantat-mot-vert-sykdom, angioødem slik som arvelig angioødem, hjernenerveskade som i meningitt, herpes gestationis, pemphigoid gestationis, pruritis scroti,

30 autoimmun prematur eggstokksvikt, plutselig hørselstap på grunn av en autoimmun tilstand, IgE-medierte sykdommer slik som anafylakse og allergisk og atopisk rhinitit, encefalitt slik som Rasmussens encefalitt og limbisk encefalitt og/eller encefalitt i hjernestammen, uveitt, slik som anterior uveitt, akutt anterior uveitt, granulomatøs uveitt, ikke-granulomatøs uveitt, fakoantigen

35 uveitt, posterior uveitt eller autoimmun uveitt, glomerulonefritt (GN) med og uten nefrotisk syndrom slik som kronisk eller akutt glomerulonefritt slik som

primær GN, immunmediert GN, membranøs GN (membranøs nefropati),
 idiopatisk membranøs GN eller idiopatisk membranøs nefropati, membranøs
 proliferativ GN (MPGN), herunder type I og type II, og hurtig progressiv GN
 (RPGN), proliferativ nefritt, autoimmun polyglandulær endokrin svikt, balanitt
 5 omfattende balanitis circumscripta plasmacellularis, balanopostitt, erythema
 annulare centrifugum, erythema dyschromicum perstans, erythema multiform,
 granuloma annulare, lichen nitidus, lichen sclerosus et atrophicus, lichen simplex
 chronicus, lichen spinulosus, lichen planus, lamellær iktyose, epidermolytisk
 hyperkeratose, premalignant keratose, pyoderma gangrenosum, allergiske
 10 tilstander og responser, matallergier, legemiddelallergier, insektallergier, sjeldne
 allergiske forstyrrelser slik som mastocytose, allergisk reaksjon, eksem
 omfattende allergisk eller atopisk eksem, asteatotisk eksem, dyshidrotisk eksem
 og vesikulær palmopantar eksem, astma slik som asthma bronchiale, bronkial
 astma, og autoimmun astma, tilstander som involverer infiltrasjon av T-celler og
 15 kroniske inflammatoriske responser, immune reaksjoner mot fremmede
 antigener slik som føtale A-B-O-blodgrupper under svangerskapet, kronisk
 pulmonal inflammatorisk sykdom, autoimmun myokarditt,
 leukocyttadhesjonssvikt, lupus, herunder lupus nephritis, lupus cerebritis,
 pediatrik lupus, ikke-renal lupus, ekstrarenal lupus, lupus discoides og lupus
 20 erythematosus discoides, alopecia lupus, SLE, slik som kutan SLE eller subakutt
 kutan SLE, neonatalt lupussyndrom (NLE), og lupus erythematosus
 disseminatus, (type I) diabetes mellitus med juvenil debut, herunder pediatrik
 IDDM, diabetes mellitus (type II-diabetes) med adult debut, autoimmun
 diabetes, idiopatisk diabetes insipidus, diabetisk retinopati, diabetisk nefropati,
 25 diabetisk kolitt, diabetisk forstyrrelse i de store arteriene, immunresponser
 assosiert med akutt og forsinket hypersensitivitet mediert av cytokiner og T-
 lymfocytter, tuberkulose, sarkoidose, granulomatose omfattende lymfomatoid
 granulomatose, agranulocytose, vaskulitider (omfattende vaskulitt i de store
 karene slik som polymyalgia rheumatica og (Takayasu) kjempecellearteritt,
 30 vaskulitt i de mellomstore karene slik som Kawasakis sykdom og polyarteritis
 nodosa/periarteritis nodosa, immunvaskulitt, CNS-vaskulitt, kutan vaskulitt,
 hypersensitivitetsvaskulitt, nekrotiserende vaskulitt slik som fibrinoid
 nekrotiserende vaskulitt og systemisk nekrotiserende vaskulitt, ANCA-negativ
 vaskulitt og ANCA-assosiert vaskulitt slik som Churg-Strauss' syndrom (CSS),
 35 Wegeners granulomatose og mikroskopisk polyangiitt), temporal arteritt,
 aplastisk anemi, autoimmun aplastisk anemi, Coombs positive anemi, Diamond-

Blackfans anemi, hemolytisk anemi eller immun hemolytisk anemi omfattende autoimmun hemolytisk anemi (AIHA), pernisiøs anemi (anemia perniciosa), Addisons sykdom, isolert anemi eller aplasi av erytropoietiske celler (PRCA), Faktor VIII-mangel, hemofili A, autoimmune neutropenier, cytopenier slik som

5 pancytopeni, leukopeni, sykdommer omfattende leukocyttediapedese, Inflammatoriske CNS-forstyrrelser, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, multippel organskadesyndrom slik som dem sekundære til septicemi, traume eller hemorrhage, antigenantistoffkompleksmedierte sykdommer, anti-GBM-sykdom, anti-fosfolipidantistoffsyndrom, motoneuritt, allergisk neuritt, Behçets

10 sykdom/syndrom, Castlemans syndrom, Goodpastures syndrom, Reynauds syndrom, Sjögrens syndrom, Stevens-Johnsons syndrom, pemphigoid eller pemphigus slik som bulløs pemphigoid, arrdannende (slimhinne)pemphigoid, hudpemphigoid, pemphigus vulgaris, paraneoplastisk pemphigus, pemphigus foliaceus, pemphigus og slimhinnepemphigoid og pemphigus erythematosus,

15 ervervet epidermolysis bullosa, okulær inflammasjon, fortrinnsvis allergisk okulær inflammasjon slik som allergisk konjunktivitt, lineær bulløs IgA-sykdom, autoimmunindusert konjunktival inflammasjon, autoimmune polyendokrinopater, Reiters sykdom eller syndrom, termal skade på grunn av en autoimmun tilstand, preeklampsi, en immun kompleksforstyrrelse slik som

20 immunkompleksnefritt, antistoffmediert nefritt, neuroinflammatoriske forstyrrelser, polyneuropatier, kronisk neuropati slik som IgM-polyneuropatier eller IgM-mediert neuropati, trombocytopeni (f.eks. som utviklet av myokardinfarktpasienter), herunder trombotisk trombocytopen purpura (TTP), post-transfusjonspurpura (PTP), heparinindusert trombocytopeni og autoimmun

25 eller immunmediert trombocytopeni omfattende for eksempel idiopatisk trombocytopen purpura (ITP) omfattende kronisk eller akutt ITP, skleritt slik som idiopatisk cerato-scleritt, episkleritt, autoimmun sykdom av testis og eggstokk omfattende autoimmun orkitt og ooforitt, primær hypotyreoidisme, hypoparatyreoidisme, autoimmune endokrine sykdommer omfattende tyreoditt

30 slik som autoimmun tyreoditt, Hashimotos sykdom, kronisk tyreoditt (Hashimotos tyreoditt), eller subakutt tyreoditt, autoimmun thyroidsykdom, idiopatisk hypotyreoidisme, Graves sykdom, Graves øyesykdom (oftalmopati eller thyroidassosiert oftalmopati), polyglandulære syndromer slik som autoimmune polyglandulære syndromer, f.eks. type I (eller polyglandulære

35 endokrinopatisyndromer), paraneoplastiske syndromer, herunder neurologiske paraneoplastiske syndromer slik som Lambert-Eatons myastenisk syndrom eller

Eaton-Lamberts syndrom, stiff-man- eller stiff-person-syndrom, encefalomyelitt slik som allergisk encefalomyelitt eller encephalomyelitis allergica og eksperimentell allergisk encefalomyelitt (EAE), myasthenia gravis slik som thymomassosiert myasthenia gravis, cerebellar degenerasjon, neuromyotoni, 5 opsoklonus eller opsoklonus-myoklonus-syndrom (OMS), og sensorisk neuropati, multifokal motorisk neuropati, Sheehans syndrom, autoimmun hepatitt, kronisk hepatitt, lupoid hepatitt, kjempecellehepatitt, kronisk aktiv hepatitt eller autoimmun kronisk aktiv hepatitt, pneumonitt slik som lymfoid interstitiell pneumonitt (LIP), bronchiolitis obliterans (ikke-transplantat) vs. NSIP, Guillain- 10 Barrés syndrom, Bergers sykdom (IgA-nefropati), idiopatisk IgA-nefropati, lineær IgA-dermatose, akutt febril neutrofil dermatose, subkorneal pustular dermatose, transient akantolytisk dermatose, cirrhose slik som primær biliær cirrhose og pneumonocirrhose, autoimmunt enteropatisyndrom, cøliaki, cøliakisprue (glutenenteropati), refraktær sprue, idiopatisk sprue, 15 cryoglobulinemi slik som blandet cryoglobulinemi, amyloτροφisk lateral sklerose (ALS; Lou Gehrigs sykdom), kransarteriesykdom, autoimmun øresykdom slik som autoimmun sykdom i indre øre (AIED), autoimmunt hørselstap, polykondritt slik som refraktær eller residivert eller residiverende polykondritt, pulmonal alveolar proteinose, keratitt slik som Cogans syndrom / ikke-syfilittisk interstitiell 20 keratitt, Bells parese, Sweets sykdom/syndrom, autoimmun rosacea, zosterassosiert smerte, amyloidose, en ikke-kreftfremkallende lymfocytose, en primær lymfocytose, som omfatter monoklonal B-cellelymfocytose (f.eks. godartet monoklonal gammopati og monoklonal gammopati av usikker betydning MGUS), perifer neuropati, paraneoplastisk syndrom, kanalopatier slik som 25 epilepsi, migrene, arytmi, muskulære forstyrrelser, døvhhet, blindhet, periodisk paralyse og kanalopatier i CNS, autisme, inflammatorisk myopati, fokal eller segmental eller fokal segmental glomerulosklerose (FSGS), endokrin oftalmopati, uveoretinitt, korioretinitt, autoimmun hepatologisk forstyrrelse, fibromyalgi, multipel endokrin svikt, Schmidts syndrom, adrenalitt, gastrisk atrofi, presenil 30 demens, demyelinierende sykdommer slik som autoimmune demyelinierende sykdommer og kronisk inflammatorisk demyelinierende polyneuropati, Dresslers syndrom, alopecia areata, alopecia totalis, CREST-syndrom (kalsinose, Raynauds fenomenon, øsofageal dysmotilitet, sklerodaktyli og telangiektasi), mannlig og kvinnelig autoimmun infertilitet, f.eks. på grunn av anti-spermatozoane 35 antistoffer, blandet bindevevssykdom, Chagas' sykdom, reumatisk feber, rekurrent abort, treskelunge, erythema multiforme, post-kardiotomisyndrom,

Cushings syndrom, fugleelskerlunge, allergisk granulomatøs angitt, godartet lymfatisk angitt, Alports syndrom, alveolitt slik som allergisk alveolitt og fibroserende alveolitt, interstitiell lungesykdom, transfusjonsreaksjon, lepra, malaria, parasittiske sykdommer slik som leishmaniase, kypanosomiase, 5 bilhartioze, askariase, aspergillose, Sampters syndrom, Caplans syndrom, dengue, endokarditt, endomyokardial fibrose, diffus interstitiell pulmonal fibrose, interstitiell lungefibrose, fibroserende mediastinit, pulmonal fibrose, idiopatisk pulmonal fibrose, cystisk fibrose, endoftalmitt, erythema elevatum et diutinum, erythroblastosis fetalis, eosinofil fasciitt, Shulmans syndrom, Feltys syndrom, 10 flariase, cyklitt slik som kronisk cyklitt, heterokronisk cyklitt, iridocyklitt (akutt eller kronisk), eller Fuchs cyklitt, Henoch-Schonlein purpura, humant immunsviktvirus-infeksjon (HIV), SCID, ervervet immunsviktsyndrom (AIDS), ECHO-virusinfeksjon, sepsis (systemisk inflammatorisk responssyndrom (SIRS)), endotoksemi, pankreatitt, tyroksikose, parvovirusinfeksjon, røde hunder-virus- 15 infeksjon, post-vaksineringssyndromer, kongenital røde hunder-infeksjon, Epstein-Barr-virusinfeksjon, kusma, Evans' syndrom, autoimmun gonadal svikt, Sydenhams chorea, post-streptokokkal nefritt, thromboangitis obliterans, tyrotoksikose, tabes dorsalis, korioiditt, kjempecellepolymyalgi, kronisk hypersensitivitetspneumonitt, konjunktivitt, slik som vernal katarr, 20 ceratoconjunctivitis sicca og epidemisk keratokonjunktivitt, idiopatisk nefrittisk syndrom, minimal change-nefropati, godartet familial og iskemireperfusjonsskade, transplantatorganreperfusjon, retinal autoimmunitet, ledinflammasjon, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveis-/lungesykdom, silikose, after, aftøs stomatitt, arteriosklerotiske forstyrrelser (cerebral vaskulær 25 insuffisiens) slik som arteriosklerotisk encefalopati og arteriosklerotisk retinopati, aspermiogenese, autoimmun hemolyse, Boecks sykdom, kryoglobulinemi, Dupuytrens kontraktur, endophthalmia phacoanaphylactica, enteritis allergica, erythema nodosum leprosum, idiopatisk facialisparese, kronisk utmattelsessyndrom, febris rheumatica, Hamman-Richs sykdom, sensoneuralt 30 hørselstap, haemoglobinuria paroxysmatica, hypogonadisme, ileitis regionalis, leukopeni, mononucleosis infectiosa, tverrsnittsmyelitt, primær idiopatisk myksedem, nefrose, ophthalmia sympathica (sympatetisk oftalmitt), neonatal oftalmitt, optisk neuritt, orchitis granulomatosa, pankreatitt, polyradiculitis acuta, pyoderma gangrenosum, Quervains tyreoiditt, ervervet miltatrofi, ikke- 35 ondartet tymom, lymfocellulær tymitt, vitiligo, toksisk sjokksyndrom, matforgiftning, tilstander som involverer infiltrasjon av T-celler,

leukocyttadhesjonsmangel, immunresponser forbundet med akutt og forsinket hypersensitivitet mediert av cytokiner og T-lymfocytter, sykdommer som involverer leukocyttadiapedese, flerorganskadesyndrom, antigenantistoffkompleks-medierte sykdommer, anti-GBM-sykdom, autoimmune polyendokrinopatii, eggstokkbetennelse, primær myksedem, autoimmun atrofisk gastritt, reumatiske sykdommer, blandet bindevevssykdom, nefrotisk syndrom, insulitt, polyendokrin svikt, autoimmune polyglandulære syndromer, herunder polyglandulært syndrom type 1, idiopatisk hypoparatyreoidisme med adult debut (AOIH), kardiomyopati slik som fortynnet kardiomyopati, epidermolysis bullosa acquisita (EBA), hemokromatose, myokarditt, nefrotisk syndrom, primær skleroserende kolangitt, purulent eller ikke-purulent sinusitt, akutt eller kronisk sinusitt, etmoid, frontal, maksillær, eller sfenoid sinusitt, allergisk sinusitt, en eosinofilrelatert forstyrrelse slik som eosinofili, pulmonal infiltrasjon eosinofili, eosinophilia-myalgia syndrom, Löfflers syndrom, kronisk eosinofil pneumoni, tropisk pulmonær eosinofili, bronkopneumonisk aspergillose, aspergillom eller granulomer inneholdende eosinofiler, anafylakse, spondyloartropatii, seronegative spondyloartritider, polyendokrin autoimmun sykdom, skleroserende kolangitt, sclera, episclera, kronisk mukokutan kandidiase, Brutons syndrom, transient hypogammaglobulinemi hos spedbarn, Wiskott-Aldrichs syndrom, ataksia-telangiektasia-syndrom, angiektase, autoimmune forstyrrelser assosiert med kollagensykdom, revmatisme slik som kronisk artrorevmatisme, lymfadenitt, reduksjon i blodtrykksrespons, vaskulær dysfunksjon, vevsskade, kardiovaskulær iskemi, hyperalgesi, renal iskemi, cerebral iskemi, og sykdom ved vaskularisering, allergiske hypersensitivitetsforstyrrelser, glomerulonefritider, reperfusjonsskade, iskemisk reperfusjonsforstyrrelse, reperfusjonsskade av myokardialt eller annet vev, lymfomatøs trakeobronkitt, inflammatoriske dermatoser, dermatoser med akutte inflammatoriske komponenter, multippel organsvikt, bulløse sykdommer, renal kortikal nekrose, akutt purulent meningitt eller andre inflammatoriske forstyrrelser i sentralnervesystemet, okulære og orbitale inflammatoriske forstyrrelser, granulocyttransfusjonassosierte syndromer, cytokinindusert toksisitet, narkolepsi, akutt alvorlig inflammasjon, kronisk intraktabel inflammasjon, pyelitt, endarterial hyperplasi, magesår, valvulitt og endometriose. Slike sykdommer tenkes heri behandlet ved tilførsel av et antistoff som binder til en B-celleoverflatemarkør, slik som CD79b, og omfatter tilførsel av et ukonjugert ("nakent") antistoff eller et antistoff konjugert til et

cytotoksisk stoff som beskrevet heri. Slike sykdommer tenkes også heri behandlet ved kombinasjonsbehandling omfattende et anti-CD79b-antistoff eller anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugat ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med et annet antistoff eller antistofflegemiddelkonjugat, et annen cytotoxisk stoff, stråling eller annen behandling tilført samtidig eller i serie.

Med "behandle" eller "behandling" eller "lindring" menes både terapeutisk behandling og forebyggende tiltak, hvor gjenstanden er å forhindre eller bremse den utpekte patologiske tilstanden eller forstyrrelsen. De som trenger behandling, omfatter dem som allerede har forstyrrelsen, og dem som er utsatt for å få forstyrrelsen, eller dem som kan unngå forstyrrelsen. En pasient eller et pattedyr er "behandlet" med hell for en CD79b-polypeptiduttrykkende kreft hvis pasienten etter å ha mottatt en terapeutisk mengde av et anti-CD79b-antistoff ifølge fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelse viser synlig og/eller målbar reduksjon eller under fravær av én eller flere av følgende: reduksjon i antall kreftceller eller fravær av kreftcellene, reduksjon i tumorstørrelsen, inhibering (dvs. en viss bremsing og fortrinnsvis stopp) av kreftcelleinfiltrasjon i perifere organer omfattende spredningen av kreft i bløtvev og ben, inhibering (dvs. en viss bremsing og fortrinnsvis stopp) av tumormetastase, en viss inhibering av tumorvekst og/eller en viss lindring, én eller flere av symptomene assosiert med den spesifikke krefttypen, redusert morbiditet og mortalitet og forbedring i livskvalitetsproblemer. I den grad anti-CD79b-antistoffet kan forhindre vekst og/eller drepe eksisterende kreftceller, kan det være cytostatisk og/eller cytotoxisk. Reduksjon av disse tegnene eller symptomene kan også føles av pasienten.

Parameterne ovenfor for vurdering av vellykket behandling og forbedring i sykdommen er lett målbare ved hjelp av rutineprosedyrer som er kjent for en lege. For kreftbehandling kan virkningen måles for eksempel ved vurdering av tiden før progresjon av sykdommen (TTP) og/eller ved bestemmelse av responshastigheten (RR). Metastase kan bestemmes ved gjennomføring av tester og ved benskanning og tester for kalsiumnivåer og andre enzymer for å bestemme spredning til benet. CT-skanninger kan også utføres for å se etter spredning til bekkenet og lymfeknuter i området. Brystrøntgen og måling av enzymnivåer i leveren ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent i teknikken, anvendes for å se etter metastase til henholdsvis lungene og leveren. Andre

rutinemessige fremgangsmåter for overvåkning av sykdom omfatter transrektal ultrasonografi (TRUS) og transrektal nålebiopsi (TRNB).

5 For blærekreft, som er en mer lokalisert kreft, omfatter fremgangsmåter for å bestemme progresjon av sykdom cytologisk urinveisvurdering ved hjelp av cystoskopi, overvåkning for å se etter forekomst av blod i urinen, visualisering av urinveiene ved sonografi eller et intravenøst pyelogram, computertomografi (CT) og magnetisk resonanstomografi (MR). Forekomsten av fjerne metastaser kan vurderes ved hjelp av CT av abdomenet, brystrøntgen eller radionuklid
10 bildediagnostikk av skjelettet.

Med "kronisk" tilførsel menes tilførsel av stoffene i en kontinuerlig modus som, i motsetning til en akutt modus, opprettholder den opprinnelige terapeutiske virkningen (aktiviteten) over en lengre tidsperiode. "Intermitterende" tilførsel er
15 behandling som ikke gis kontinuerlig uten avbrudd, men som heller er syklisk av natur.

En "person" er et virveldyr. I visse utførelsesformer er virveldyret et pattedyr. Pattedyr omfatter blant annet gårdsdyr (slik som kuer), dyr som brukes til idrett, kjæledyr (slik som katter, hunder og hester), primater, mus og rotter. I visse
20 utførelsesformer er et pattedyr et menneske.

Med "pattedyr" menes i sammenheng med behandling og lindring av symptomene på kreft ethvert dyr klassifisert som et pattedyr, herunder
25 mennesker, husdyr, gårdsdyr, dyrehagedyr, dyr som brukes til idrett, eller kjæledyr, slik som hunder, katter, kveg, hester, sauer, griser, geiter, kaniner osv. Pattedyret er fortrinnsvis et menneske.

Tilførsel "i kombinasjon med" ett eller flere ytterligere terapeutiske stoffer
30 omfatter samtidig og kontinuerlig tilførsel i en hvilken som helst rekkefølge.

Med "bærestoffer" menes som anvendt heri farmasøytisk akseptable bærestoffer, hjelpestoffer eller stabiliseringsmidler som er ikke-toksiske for cellen eller pattedyret som eksponeres derfor ved de anvendte dosene og
35 konsentrasjonene. Det fysiologisk akseptable bærestoffet er ofte en vandig pH-bufret løsning. Eksempler på fysiologisk akseptable bærestoffer omfatter buffere

slik som fosfat, citrat og andre organiske syrer, antioksidanter omfattende askorbinsyre, polypeptid med lav molekylvekt (mindre enn ca. 10 enheter), proteiner, slik som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner, hydrofile polymerer slik som polyvinylpyrrolidon, aminosyrer slik som glycin, glutamin, asparagin, arginin eller lysin, monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater omfattende glukose, mannose eller dekstriner, chelaterende stoffer slik som EDTA, sukkeralkoholer slik som mannitol eller sorbitol, saltdannende motioner slik som natrium og/eller ikke-ioniske surfaktanter slik som TWEEN®, polyetylglykol (PEG) og PLURONICS®.

10

Med "fast fase" menes en ikke-vandig matrise hvortil et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse kan binde. Eksempler på faste faser integrert heri omfatter dem som er dannet delvis eller helt av glass (f.eks. kontrollert poreglass), polysakkarider (f.eks. agarose), polyakrylamider, polystyren, polyvinylalkohol og silikoner. I visse utførelsesformer kan den faste fasen avhengig av konteksten omfatte brønnen i en assayplate; i andre er den en rensekolonne (f.eks. en affinitetskromatografikolonne). Denne betegnelsen omfatter også en diskontinuerlig fast fase av diskrete partikler, slik som dem beskrevet i US-patent nr. 4 275 149.

20

Et "liposom" er en liten vesikkel sammensatt av forskjellige typer av lipider, fosfolipider og/eller surfaktanter som er nyttige for tilførsel av et legemiddel (slik som et CD79b-antistoff) til et pattedyr. Liposomets komponenter er vanligvis ordnet i en tosjiktsformasjon lik lipidarrangementet av biologiske membraner.

25

Et "lite" molekyl eller "lite" organisk molekyl er definert heri til å ha en molekylvekt under ca. 500 dalton.

En "person" eller "pasient" er et virveldyr. I visse utførelsesformer er virveldyret et pattedyr. Pattedyr omfatter blant annet gårdsdyr (slik som kuer), dyr som brukes til idrett, kjæledyr (slik som katter, hunder og hester), primater, mus og rotter. I visse utførelsesformer er et pattedyr et menneske.

Med "farmasøytisk formulering" menes en fremstilling som er i en slik form at virkestoffets biologiske aktivitet er virkningsfull, og som ikke inneholder

35

ytterligere komponenter som er uakseptabelt toksiske for en pasient hvortil formuleringen tilføres. Slik formulering kan være steril.

5 En "steril" formulering er aseptisk eller fri for alle levende mikroorganismer og deres sporer.

Med en "virkningsfull mengde" av et antistoff menes som beskrevet heri en mengde som er tilstrekkelig til å utføre et spesifikt angitt formål. En "virkningsfull mengde" kan bestemmes empirisk og på en rutinemessig måte i
10 forhold til det angitte formålet.

Med "terapeutisk virkningsfull mengde" menes en mengde av et antistoff eller et annet legemiddel som er virkningsfull for å "behandle" en sykdom eller forstyrrelse hos en pasient eller et pattedyr. Ved kreft kan den terapeutisk
15 virkningsfulle mengden av legemiddelet redusere antallet kreftceller, redusere tumorstørrelsen, inhibere (dvs. til en viss grad bremse og fortrinnsvis stoppe) kreftcelleinfiltrasjon i perifere organer, inhibere (dvs. til en viss grad bremse og fortrinnsvis stoppe) tumormetastase, til en viss grad inhibere tumorvekst og/eller til en viss grad lindre én eller flere av symptomene assosiert med kreft.
20 Se definisjonen heri av "behandling". I den grad legemiddelet kan forhindre vekst og/eller drepe eksisterende kreftceller, kan det være cytostatisk og/eller cytotoksisk. Med "forebyggende virkningsfull mengde" menes en virkningsfull mengde, ved doser og i nødvendige tidsperioder, for å oppnå det ønskede forebyggende resultat. Siden en forebyggende dose anvendes på pasienter før
25 eller i en tidlig fase av en sykdom, vil mengden vanligvis, men ikke nødvendigvis, være mindre enn den terapeutisk virkningsfulle mengden.

En "vekstinhiberende mengde" av et anti-CD79b-antistoff er en mengde som kan inhibere veksten av en celle, særlig tumor-, f.eks. kreftcelle, enten *in vitro* eller
30 *in vivo*. En "vekstinhiberende mengde" av et anti-CD79b-antistoff i sammenheng med inhibering av neoplastisk cellevekst kan bestemmes empirisk og på en rutinemessig måte.

En "cytotoksisk mengde" av et anti-CD79b-antistoff er en mengde som kan
35 forårsake destruksjon av veksten av en celle, særlig tumor-, f.eks. kreftcelle, enten *in vitro* eller *in vivo*. En "cytotoksisk mengde" av et anti-CD79b-antistoff i

sammenheng med inhibering av neoplastisk cellevekst kan bestemmes empirisk og på en rutinemessig måte.

En "CD79b-uttrykkende celle" er en celle som uttrykker et endogent eller
5 transfektet CD79b-polypeptid enten på celleoverflaten eller i en utskilt form. En
"CD79b-uttrykkende kreft" er en kreft omfattende celler hvor et CD79b-
polypeptid finnes på celleoverflaten, eller som produserer og utskiller et CD79b-
polypeptid. En "CD79b-uttrykkende kreft" produserer eventuelt tilstrekkelige
nivåer av CD79b-polypeptid på overflaten av cellene derav, slik at et anti-
10 CD79b-antistoff kan binde dertil og ha en terapeutisk virkning med hensyn til
kreften. I en annen utførelsesform produserer og utskiller en "CD79b-
uttrykkende kreft" eventuelt tilstrekkelige nivåer av CD79b-polypeptid, slik at en
anti-CD79b-antistoffantagonist kan binde dertil og ha en terapeutisk virkning
med hensyn til kreften. Med hensyn til sistnevnte kan antagonisten være et
15 antisensoligonukleotid som reduserer, inhiberer eller forhindrer tumorcellenes
produksjon og utskilling av det utskilte CD79b-polypeptidet. En kreft som
"overuttrykker" et CD79b-polypeptid, er en som har i det vesentlige høyere
nivåer av CD79b-polypeptid på celleoverflaten derav, eller som produserer og
utskiller, sammenlignet med en ikke-kreftfremkallende celle samme vevstype.
20 Slik overekspresjon kan forårsakes av genamplifikasjon eller ved økt
transkripsjon eller translasjon. Overekspresjon av CD79b-polypeptid kan
bestemmes i et påvisningsassay eller et prognostisk assay ved vurdering av økte
nivåer av CD79b-proteinet på overflaten av en celle, eller utskilt av cellen (f.eks.
via et immunhistokjemiassay ved hjelp av anti-CD79b-antistoffer fremstilt mot
25 et isolert CD79b-polypeptid som kan fremstilles ved hjelp av rekombinant DNA-
teknologi fra en isolert nukleinsyre som koder for CD79b-polypeptid, FACS-
analyse osv.). Man kan eventuelt eller i tillegg måle nivåer av CD79b-
polypeptidkodende nukleinsyre eller mRNA i cellen, f.eks. via fluorescerende
hybridisering *in situ* ved hjelp av en nukleinsyrebasert sonde tilsvarende en
30 CD79b-kodende nukleinsyre eller komplementet derav, (FISH, se WO98/45479
publisert oktober 1998), Southern Blotting, Northern Blotting eller
polymerasekjedereaksjonsteknikker (PCR), slik som sanntidskvantitativ PCR (RT-
PCR). Man kan også studere overekspresjon av CD79b-polypeptid ved måling av
utfelt antigen i en biologisk væske slik som serum, f.eks. ved hjelp av
35 antistoffbaserte assayer (se også for eksempel US-patent nr. 4 933 294 utstedt
12. juni 1990, WO91/05264 publisert 18. april 1991, US-patent 5 401 638

utstedt 28. mars 1995 og Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73–80 (1990)). Foruten ovennevnte assayer er en rekke *in vivo*-assayer tilgjengelige for fagpersoner. Man kan for eksempel eksponere celler i pasientens kroppen for et antistoff som eventuelt er merket med en påvisbar markør, f.eks. et radioaktivt isotop, og binding av antistoffet til celler i pasienten kan vurderes, f.eks. ved hjelp av skanning etter radioaktivitet eller ved analyse av en biopsi tatt av en pasient som tidligere er eksponert for antistoffet.

Med "immunadhesin" menes som anvendt heri antistofflignende molekyler som kombinerer et heterologt proteins bindingsspesifisitet (et "adhesin") med effektorfunksjonene til konstante domener fra immunglobulin. Immunadhesiner omfatter strukturelt en fusjon av en aminosyresekvens med ønsket bindingsspesifisitet som er en annen enn antigengjenkjenningen og bindingsstedet for et antistoff (dvs. er "heterolog"), og et konstant domenes sekvens fra immunglobulin. Adhesindelen av et immunadhesinmolekyl er typisk en kontinuerlig aminosyresekvens omfattende minst bindingsstedet for en reseptor eller en ligand. Det konstante domenets sekvens fra immunglobulin i immunadhesinet kan oppnås fra ethvert immunglobulin, slik som undertypene IgG-1, IgG-2, IgG-3 eller IgG-4, IgA (omfattende IgA-1 og IgA-2), IgE, IgD eller IgM.

Med "markør" menes som anvendt heri en påvisbar forbindelse eller sammensetning som er konjugert direkte eller indirekte til antistoffet for å danne et "merket" antistoff. Markøren kan være påvisbar i seg selv (f.eks. radioisotopmarkører eller fluorescerende markører) eller kan, ved en enzymatisk markør, katalysere kjemisk endring av en substratforbindelse eller -sammensetning som er påvisbar.

Med "cytotoksisk stoff" menes som anvendt heri et stoff som inhiberer eller forhindrer funksjonen av celler og/eller forårsaker destruksjon av celler. Betegnelsen er ment å omfatte radioaktive isotoper (f.eks. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² og radioaktive isotoper av Lu), kjemoterapeutiske stoffer, f.eks. metotreksat, adriamicin, vinkaalkaloider (vinkristin, vinblastin, etoposid), doksorubicin, melfalan, mitomycin C, klorambucil, daunorubicin eller andre interkalerende stoffer, enzymer og fragmenter derav slik som nukleolytiske enzymer, antibiotika og toksiner slik som små molekyeltoksiner eller

enzymatisk aktive toksiner av bakterie-, sopp-, plante- eller dyreopprinnelse, herunder fragmenter og/eller varianter derav, og de forskjellige antitumor- eller antikreftstoffene beskrevet nedenfor. Andre cytotoksiske stoffer er beskrevet nedenfor. Et tumoricidalt stoff forårsaker destruksjon av tumorceller.

5

Et "toksin" er ethvert stoff som kan ha en negativ virkning på veksten eller proliferasjonen av en celle.

Et "kjemoterapeutisk stoff" er en kjemisk forbindelse som er nyttig for
 10 behandling av kreft, uavhengig av virkemekanisme. Klasser av
 kjemoterapeutiske stoffer omfatter blant annet: alkylerende stoffer,
 antimetabolitter, vegetabiliske antimitotiske alkaloider, cytoksiske
 antibiotika / antitumorantibiotika, topoisomeraseinhiberere, antistoffer,
 fotosensibiliserende midler og kinaseinhiberere. Kjemoterapeutiske stoffer
 15 omfatter forbindelser anvendt i "målrettet behandling" og konvensjonell
 kjemoterapi. Eksempler på kjemoterapeutiske stoffer omfatter: erlotinib
 (TARCEVA®), Genentech/OSI Pharm.), dosetaksel (TAXOTERE®, Sanofi-
 Aventis), 5-FU (fluoruracil, 5-fluoruracil, CAS-nr. 51-21-8), gemcitabin
 (GEMZAR®, Lilly). PD-0325901 (CAS-nr. 391210-10-9, Pfizer), cisplatin (cis-
 20 diamin,diklorplatina(II), CAS-nr. 15663-27-1), karboplatin (CAS-nr. 41575-94-
 4), paklitaksel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.),
 trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomid(4-metyl-5-okso-
 2,3,4,6,8-pentazabisyklo[4.3.0]nona-2,7,9-trien-9-karboksamid, CAS-nr. 85622-
 93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoksifen ((Z)-2-[4-(1,2-
 25 difenylbut-1-enyl)fenoksy]-N,N-dimetyl-etanamin, NOLVADEX®, ISTUBAL®,
 VALODEX®), og doksorubicin (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD og rapamycin.

Flere eksempler på kjemoterapeutiske stoffer omfatter: oksaliplatin
 (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sutent
 30 (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinibmesylat
 (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (Mek-inhiberer, Exelixis, WO 2007/044515),
 ARRY-886 (Mek-inhiberer. AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126
 (PI3K-inhiberer, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (PI3K-inhiberer,
 Novartis), XL-147 (PI3K-inhiberer, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis),
 35 fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leukovorin (folinsyre), rapamycin
 (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith

Kline), lonafarnib (SARASAR™. SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotekan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifamib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (kremoforfri), albuminkonstruerte

5 nanopartikkelformuleringer av paklitaksel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, II), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), kloranmbucil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), kanfosfamid (TELCYTA®, Telik), tiotepa og syklosfosfamid (CYTOXAN®, NEOSAR®); alkylsulfonater slik som busulfan,

10 improsulfan og piposulfan, aziridiner slik som benzodopa, karboquon, meturedopa og uredopa, etyleniminer og metylamelaminer omfattende altretamin, trietylenmelamin, trietylenfosforamid, trietylentiofosforamid og trimetylomelamin, acetogener (særlig bullatacin og bullatacinon), et kamptotecin (omfattende det syntetiske analoge topotekan), bryostatin, callystatin, CC-1065

15 (omfattende deres adozelesin-, karzelesin- og syntetiske bizelesinanaloger), kryptofyciner (særlig kryptofycin 1 og kryptofycin 8), dolastatin, duokarmycin (omfattende de syntetiske analogene, KW-2189 og CB1-TM1), eleuterobin, pankratistatin, et sarkodistyin, spongistatin, nitrogensenneper slik som klorambucil, klornafazin, klorofosfamid, estramustin, ifosfamid, mekloretoamin,

20 mekloretoaminoksidhydroklorid, melfalan, novembisin, fenesterin, prednimustin, trofosfamid, uracilsennep, nitrosoureaer slik som karmustin, klorozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin og ranimnustin, antibiotika slik som enediyn-antibiotika (f.eks. kalikeamicin, kalikeamicin gammaI, kalikeamicin omega II (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183–186), dynemicin, dynemicin A,

25 bisfosfonater slik som klodronat, et esperamicin, samt neokarzinostatinkromofor og relaterte kromproteinenediynantibiotikakromoforer), aklacinomyciner, aktinomycin, autramycin, azaserin, bleomyciner, kaktinomycin, karabycin, karminomycin, karzinofilin, kromomycin, daktinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-okso-L-norleucin, morfolino-doksorubicin,

30 cyanomorfolino-doksorubicin, 2-pyrrolino-doksorubicin og deoksydoksorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomyciner slik som mitomycin C, mykofenolsyre, nogalamycin, olivomyciner, peplomycin, porfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimeks, zinostatin, zorubicin; anti-metabolitter slik som

35 metotreksat og 5-fluoruracil (5-FU), folsyreanaloger slik som denopterin, metotreksat, pteropterin, trimetreksat, purinanaloger slik som fludarabin, 6-

- merkaptopurin, tiamiprin, tioguanin, pyrimidinanaloger slik som ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, karmofur, cytarabin, dideoksyuridin, doksifluridin, enocitabin, floksuridin, androgener slik som kalusteron, dromostanolonpropionat, epitiostanol, mepitiostan, testolakton, anti-adrenaler slik som aminoglutetimid,
- 5 mitotan, trilostan, folsyrerefill slik som folinsyre, aceglaton, aldofosfamidglykosid, aminolevulinsyre, eniluracil, amsakrin, bestrabucil, bisantren, edatraksat, defofamin, demekolcin, diaziquon, elfornitin, elliptiniumacetat, et epotilon, etoglucid, galliumnitrat, hydroksyurea, lentinan, lonidainin, maytansinoider slik som maytansin og ansamitociner; mitoguazon,
- 10 mitoksantron, mopidanmol, nitraerin, pentostatin, fenamet, pirarubicin, losoksantron, podofyllinsyre, 2-etylhydrazid, prokarbazin, PSK®-polysakkaridkompleks (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoksan, rizoksin, sizofiran, spirogermanium, tenuazonisyre, triaziquon, 2,2',2"-triklorotrietylamin, trikotecener (særlig T-2 toksin, verrakurin A, roridin A og anguidin), uretan,
- 15 vindesin, dakarbazin, mannomustin, mitobronitol, mitolaktol, pipobroman, gacytosin, arabinosid ("Ara-C"), syklofosfamid, tiotepa, 6-tioguanin, merkaptopurin, metotreksat, platinaanaloger slik som cisplatin og karboplatin, vinblastin, etoposid (VP-16), ifosfamid, mitoksantron, vinkristin, vinorelbin (NAVELBINE®), novantron, teniposid, edatreksat, daunomycin, aminopterin,
- 20 kapecitabin (XELODA®, Roche); ibandronat, CPT-11, topoisomeraseinhiberer RFS 2000, difluormetylnitritin (DMFO), retinoider slik som retinsyre og farmasøytisk akseptable salter, syrer og derivater av hvilke som helst av ovenstående.
- 25 Også omfattet i definisjonen av "kjemoterapeutisk stoff" er: i) antihormonstoffer som regulerer eller inhiberer hormonvirkning på tumorer slik som antiøstrogener og utvalgte østrogenreseptormodulatorer (SERM-er), herunder for eksempel tamoksifen (omfattende NOLVADEX®, tamoksifensitrat), raloksifen, droloksifen, 4-hydroksytamoksifen, trioksifen, keoksifen, LY117018, onapriston og
- 30 FARESTON® (toremifinesitrat), ii) aromataseinhiberere som inhiberer enzymaromatasen, som regulerer østrogenproduksjon i binyrene, slik som for eksempel 4(5)-imidazoler, aminoglutetimid, MEGASE® (megestrolacetat), AROMASIN® (eksemestan, Pfizer), formestan, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol, Novartis) og ARIMIDEX® (anastrozol, AstraZeneca), iii)
- 35 antiandrogener slik som flutamid, nilutamid, bikalutamid, leuprolid og goserelin samt troksacitabin (en 1,3-dioksolannukleosidcytosinanalog), iv)

proteinkinaseinhiberere slik som MEK-inhiberere (WO 2007/044515), v) lipidkinaseinhiberere, vi) antisensoligonukleotider, særlig dem som inhiberer ekspresjon av gener i signaliserende ledningsveier implisert i aberrant celleproliferasjon, f.eks. PKC-alfa, Raf og H-Ras, slik som oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.), vii) ribozymmer slik som VEGF-ekspresjonsinhiberere (f.eks. ANGIOZYME®) og HER2-ekspresjonsinhiberere viii) vaksiner slik som genterapivaksiner for eksempel ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® og VAXID®, PROLEUKIN® rIL-2, topoisomerase-1-inhiberere slik som LURTOTECAN®, ABARELIX® rmRH, ix) antiangiogene stoffer slik som bevacizumab (AVASTIN®, Genentech) og farmasøytisk akseptable salter, syrer og derivater av hvilke som helst av ovenstående.

Også omfattet i definisjonen av "kjemoterapeutiske stoffer" er terapeutiske antistoffer slik som alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech), cetuximab (ERBITUX®, Imclone), panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituksimab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa) og antistoffetlegemiddelkonjugatet, gemtuzumabozogamicin (MYLOTARG®, Wyeth).

Med "vekstinhiberende stoff" menes som anvendt heri en forbindelse eller sammensetning som inhiberer veksten av en celle, særlig en CD79b-uttrykkende kreftcelle, enten *in vitro* eller *in vivo*. Det vekstinhiberende stoffet kan således være en som i det vesentlige reduserer prosenten av CD79b-uttrykkende celler i S-fase. Eksempler på vekstinhiberende stoffer omfatter stoffer som blokkerer cellesyklusprogresjon (på et annet sted enn S-fase), slik som stoffer som induserer G1-stopp og M-fasestopp. Klassiske M-faseblokkere omfatter vinkaer (vinkristin og vinblastin), taksaner og topoisomerase II-inhiberere slik som doksorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposid og bleomycin. De stoffene som stopper G1, går også over til S-fasestopp, f.eks. DNA-alkylerende stoffer slik som tamoksifen, prednison, dakarbazin, mekloretoamin, cisplatin, metotreksat, 5-fluoruracil og ara-C. Mer informasjon finnes i The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., kapittel 1, med tittelen "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic legemidler" av Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), særlig pkt. 13. Taksanene (paklitaksel og docetaksel) er antikreftlegemidler som begge er avledet av barlind. Docetaksel (TAXOTERE®,

Rhone-Poulenc Rorer), avledet av den europeiske barlinden, er en semisyntetisk analog av paklitaksel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paklitaksel og docetaksel fremmer sammenstilling av mikrotubuler fra tubulindimerer og stabiliserer mikrotubuler ved å forhindre depolymerisering som resulterer i inhibering av mitose i celler.

"Doksorubicin" er et antrasyklint antibiotikum. Det fulle navnet til doksorubicin er (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy- α -L-lykso-heksapyranosyl)oksy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroksy-8-(hydroksyacetyl)-1-metoksy-5,12-naftacenedion.

Betegnelsen "cytokin" er en generisk betegnelse for proteiner som frisettes fra en cellepopulasjon som virker på en annen celle som intercellulære mediatorer. Eksempler på slike cytokiner er lymfokiner, monokiner og tradisjonelle polypeptidhormoner. Omfattet blant cytokinene er veksthormon slik som humant veksthormon, humant N-metionylveksthormon og bovint veksthormon, parathyroidhormon, tyroksin, insulin, proinsulin, relaksin, prorelaksin, glykoproteinormoner slik som hårsekkstimulerende hormon (FSH), thyroidstimulerende hormon (TSH) og luteiniserende hormon (LH), hepatisk vekstfaktor, fibroblastvekstfaktor, prolaktin, placentalt laktogen, tumornekrosefaktor- α og - β , mullerianinhiberende stoff, mus-gonadotropin-assosiert peptid, inhibin, aktivin, vaskulær endotelial vekstfaktor, integrin, trombopoietin (TPO), nervevekstfaktorer slik som NGF- β , blodplatevekstfaktor, transformerende vekstfaktorer (TGF-er) slik som TGF- α og TGF- β , insulinlignende vekstfaktor-I og -II, erythropoietin (EPO), osteoinduktive faktorer, interferoner slik som interferon- α , - β og - γ , kolonistimulerende faktorer (CSF-er) slik som makrofag-CSF (M-CSF), granulocyt-makrofag-CSF (GM-CSF) og granulocyt-CSF (G-CSF), interleukiner (ILs) slik som IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, en tumornekrosefaktor slik som TNF- α eller TNF- β og andre polypeptidfaktorer omfattende LIF og kit-ligand (KL). Med cytokin menes som anvendt heri proteiner fra naturlige kilder eller fra rekombinant cellekultur og biologisk aktive ekvivalenter av de naturlige forekommende stukturcytokinene.

Med "pakningsvedlegg" menes anvisninger som vanligvis inngår i kommersielle pakninger for terapeutiske produkter som inneholder informasjon om

indikasjoner, anvendelse, dose, tilførsel, kontraindikasjoner og/eller advarsler vedrørende anvendelsen av slike terapeutiske produkter.

5 Med "intracellulær metabolitt" menes en forbindelse som er resultat av en metabolsk prosess eller reaksjon i en celle på et antistofflegemiddelkonjugat (ADC). Den metabolske prosessen eller reaksjonen kan være en enzymatisk prosess, slik som proteolytisk spaltning av en peptidlinker for ADC, eller hydrolyse av en funksjonell gruppe slik som et hydrazon, en ester eller et amid. Intracellulære metabolitter omfatter blant annet antistoffer og frie legemidler som har gjennomgått intracellulær spaltning etter innføring, diffusjon, opptak eller transport til en celle.

15 Med "intracellulært spaltet" og "intracellulær spaltning" menes en metabolsk prosess eller reaksjon i en celle på et antistofflegemiddelkonjugat (ADC) hvorved den kovalente bindingen, dvs. linkeren, mellom legemiddelenheten (D) og antistoffet (Ab) brytes, hvilket resulterer i at det frie legemiddelet dissosieres fra antistoffet i cellen. De spaltede enhetene av ADC-et er således intracellulære metabolitter.

20 Med "biotilgjengelighet" menes den systemiske tilgjengeligheten (dvs. blod-/plasmanivåer) av en bestemt mengde av legemiddel tilført til en pasient. Biotilgjengelighet er en absolutt betegnelse som angir måling av både tid (hastighet) og total mengde (omfang) av legemiddel som når det generelle omløpet fra en tilført doseform.

25 Med "cytotoksisk aktivitet" menes en celledrepende, cytostatisk eller vekstinhiberende virkning av et ADC eller en intracellulær metabolitt av et ADC. Cytotoksisk aktivitet kan uttrykkes som IC_{50} -verdien, som er den konsentrasjon (mol eller masse) per volumenhet hvor halvparten av cellene overlever.

30 Med "alkyl" menes som anvendt heri en mettet lineær eller forgrenet monovalent hydrokarbongruppe på ett til tolv karbonatomer (C_1 - C_{12}), hvor alkylgruppen eventuelt kan substitueres uavhengig med én eller flere substituenten beskrevet nedenfor. I en annen utførelsesform er en alkylgruppe ett til åtte karbonatomer (35 C_1 - C_8), eller ett til seks karbonatomer (C_1 - C_6). Eksempler på alkylgrupper omfatter blant annet metyl (Me, $-CH_3$), etyl (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propyl (n-Pr, n-

propyl, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-propyl (i-Pr, i-propyl, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1-butyl (n-Bu, n-butyl, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-metyl-1-propyl (i-Bu, i-butyl, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-butyl (s-Bu, s-butyl, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-metyl-2-propyl (t-Bu, t-butyl, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-pentyl (n-pentyl, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-pentyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-pentyl ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-metyl-2-butyl ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-metyl-2-butyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-metyl-1-butyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-metyl-1-butyl ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1-heksyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-heksyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-heksyl ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$), 2-metyl-2-pentyl ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-metyl-2-pentyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4-metyl-2-pentyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-metyl-3-pentyl ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-metyl-3-pentyl ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,3-dimetyl-2-butyl ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,3-dimetyl-2-butyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-heptyl, 1-oktyl og lignende.

Med "alkenyl" menes en lineær eller forgrenet monovalent hydrokarbongruppe på to til åtte karbonatomer ($\text{C}_2\text{--C}_8$) med minst ett undermetningssted, dvs. en karbon-karbon- sp^2 -dobbelbinding, hvor alkenylgruppen eventuelt kan substitueres uavhengig med én eller flere heri beskrevne substituent, og omfatter grupper med "cis-" og "trans"-retninger eller eventuelt "E-" og "Z"-retninger. Eksempler omfatter blant annet etylenyl eller vinyl ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), allyl ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) og lignende.

Med "alkynyl" menes en lineær eller forgrenet monovalent hydrokarbongruppe på to til åtte karbonatomer ($\text{C}_2\text{--C}_8$) med minst ett undermetningssted, dvs. en karbon-karbon- sp -trippelbinding, hvor alkynylgruppen eventuelt kan substitueres uavhengig med én eller flere substituent beskrevet heri. Eksempler omfatter blant annet etynyl ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), propynyl (propargyl, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) og lignende.

Med "karbonring", "karbosykl", "karbosyklisk ring" og "sykloalkyl" menes en monovalent ikke-aromatisk, mettet eller delvis umettet ring med 3 til 12 karbonatomer ($\text{C}_3\text{--C}_{12}$) som en monosyklisk ring eller 7 til 12 karbonatomer som en bisyklisk ring. Bisykliske karbonringer med 7 til 12 atomer kan konstrueres som for eksempel et bisyklo[4,5]-, [5,5]-, [5,6]- eller [6,6]-system, og bisykliske karbonringer med 9 eller 10 ringatomer kan konstrueres som et bisyklo[5,6]- eller [6,6]-system eller som broede systemer slik som bisyklo[2.2.1]heptan, bisyklo[2.2.2]oktan og bisyklo[3.2.2]nonan. Eksempler på

monosykliske karbonringer omfatter blant annet syklopropyl, syklobutyl, syklopentyl, 1-syklopent-1-enyl, 1-syklopent-2-enyl, 1-syklopent-3-enyl, sykloheksyl, 1-sykloheks-1-enyl, 1-sykloheks-2-enyl, 1-sykloheks-3-enyl, sykloheksadienyl, sykloheptyl, syklooktyl, syklononyl, syklodekyl, sykloundekyl, 5 syklododekyl og lignende.

Med "aryl" menes en monovalent aromatisk hydrokarbongruppe på 6–20 karbonatomer (C_6 – C_{20}) avledet av fjerning av ett hydrogenatom fra ett enkelt karbonatom i et aromatisk morringsystem. Noen arylgrupper er representert i 10 eksempelstrukturene som "Ar". Aryl omfatter bisykliske grupper omfattende en aromatisk ring fusjonert til en mettet, delvis umettet ring eller aromatisk karbosyklisk ring. Typiske arylgrupper omfatter blant annet grupper avledet av benzen (fenyl), substituerte benzener, naftalen, antracen, bifenyl, indenyl, indanyl, 1,2-dihydronaftalen, 1,2,3,4-tetrahydronafty l og lignende. Arylgrupper 15 er eventuelt substituert uavhengig med én eller flere heri beskrevne substituent er.

Med "heteroring," "heterosyklil" og "heterosyklisk ring" menes som anvendt om 20 hverandre heri en mettet eller delvis umettet (dvs. med én eller flere dobbelt- og/eller trippelbindinger i ringen) karbosyklisk gruppe på 3 til 20 ringatomer hvor minst ett ringatom er et heteroatom valgt fra nitrogen, oksygen, fosfor og svovel, idet de øvrige ringatomene er C, hvor én eller flere ringatomer eventuelt er uavhengig substituert med én eller flere nedenfor beskrevne substituent er. En heteroring kan være en monoring med 3 til 7 ringmedlemmer (2 til 6 25 karbonatomer og 1 til 4 heteroatomer valgt fra N, O, P og S) eller en biring med 7 til 10 ringmedlemmer (4 til 9 karbonatomer og 1 til 6 heteroatomer valgt fra N, O, P og S), f.eks.: et bisyklo[4,5]-, [5,5]-, [5,6]- eller [6,6]-system. Heteroring er beskrevet i Paquette, Leo A.; "Principles av Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), særlig kapittel 1, 3, 4, 6, 7 og 9; 30 "The Chemistry av Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), særlig volum 13, 14, 16, 19 og 28 og J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. Med "heterosyklil" menes også grupper hvor heteroringgrupper er fusjonert med en mettet, delvis umettet ring eller aromatisk karbosyklisk eller heterosyklisk ring. Eksempler på heterosykliske 35 ringer omfatter blant annet pyrrolidinyl, tetrahydrofuranyl, dihydrofuranyl, tetrahydrotienyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, tetrahydrotiopyranyl,

piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioksanyl, piperaziny, homopiperaziny, azetidiny, oksetanyl, tietanyl, homopiperidiny, oksepanyl, tiepanyl, oksazepiny, diazepiny, tiazepiny, 2-pyrroliny, 3-pyrroliny, indoliny, 2H-pyranyl, 4H-pyranyl, dioksanyl, 1,3-dioksolanyl, pyrazoliny, ditianyl, ditiolanyl, 5 dihydropyranyl, dihydrotienyl, dihydrofuranyl, pyrazolidinylimidazoliny, imidazolidiny, 3-azabisyklo[3.1.0]heksanyl, 3-azabisyklo[4.1.0]heptanyl, azabisyklo[2.2.2]heksanyl, 3H-indoly, quinoliziny og N-pyridylurea. Spiroenheter er også omfattet av denne definisjonen. Eksempler på en heterosyklisk gruppe hvor 2 ringkarbonatomer er substituert med oksoenheter (=O), er pyrimidinonyl 10 og 1,1-dioksotiomorfoliny. Heteroringgruppene heri er eventuelt substituert uavhengig med én eller flere heri beskrevne substituent.

Med "heteroaryl" menes en monovalent aromatisk gruppe på 5, 6 eller 7 medlemsringer, hvilken omfatter kondenserte ringsystemer (hvor minst én er 15 aromatisk) på 5–20 atomer, inneholdende én eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel. Eksempler på heteroarylgrupper er pyridiny (omfattende f.eks. 2-hydroksypyridiny), imidazolyl, imidazopyridiny, pyrimidinyl (omfattende f.eks. 4-hydroksypyrimidinyl), pyrazolyl, triazolyl, pyraziny, tetrazolyl, furyl, tienyl, isoksazolyl, tiazolyl, oksazolyl, isotiazolyl, 20 pyrrolyl, quinoliny, isoquinoliny, indolyl, benzimidazolyl, benzofuranyl, cinnoliny, indazolyl, indoliziny, ftalaziny, pyridaziny, triaziny, isoindolyl, pteridinyl, puriny, oksadiazolyl, triazolyl, tiadiazolyl, tiadiazolyl, furazanyl, benzofurazanyl, benzotiofenyl, benzotiazolyl, benzoksazolyl, quinazoliny, quinoksaliny, naftyridiny og furopyridiny. Heteroarylgrupper er eventuelt 25 uavhengig substituert med én eller flere heri beskrevne substituent.

Heteroringen eller heteroarylgruppene kan være karbon- eller nitrogenbundet hvor slikt er mulig. Som eksempel og ikke begrensning er karbonbundne heteroringer eller heteroaryler bundet ved posisjon 2, 3, 4, 5 eller 6 i et pyridin, 30 posisjon 3, 4, 5 eller 6 i et pyridazin, posisjon 2, 4, 5 eller 6 i et pyrimidin, posisjon 2, 3, 5 eller 6 i et pyrazin, posisjon 2, 3, 4 eller 5 i et furan, tetrahydrofuran, tiofuran, tiofen, pyrrol eller tetrahydropyrrol, posisjon 2, 4 eller 5 i et oksazol, imidazol eller tiazol, posisjon 3, 4 eller 5 i et isoksazol, pyrazol eller isotiazol, posisjon 2 eller 3 i et aziridin, posisjon 2, 3 eller 4 i et azetidin, 35 posisjon 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8 i et quinolin eller posisjon 1, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8 i et isoquinolin.

Som eksempel og ikke begrensning er nitrogenbundne heteroringer eller heteroaryler bundet ved posisjon 1 i et aziridin, azetidin, pyrrol, pyrrolidin, 2-pyrrolin, 3-pyrrolin, imidazol, imidazolidin, 2-imidazolin, 3-imidazolin, pyrazol, pyrazolin, 2-pyrazolin, 3-pyrazolin, piperidin, piperazin, indol, indolin, 1H-indazol, posisjon 2 i et isoindol eller isoindolin, posisjon 4 i et morfolin og posisjon 9 i et karbazol eller β -karbolin.

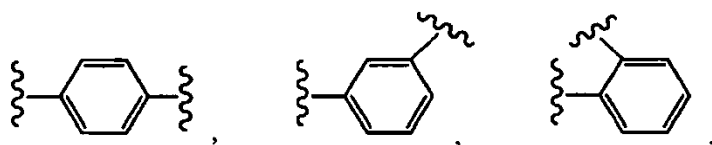
Med "alkylen" menes en mettet, forgrenet eller rettkjedet eller syklisk hydrokarbongruppe på 1–18 karbonatomer med to monovalente gruppesentre avledet av fjerning av to hydrogenatomer fra den samme eller to forskjellige karbonatomer i et moralkan. Typiske alkylenradikaler omfatter blant annet: metylen ($-\text{CH}_2-$), 1,2-etyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-propyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-butyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) og lignende.

Et " C_1 – C_{10} -alkylen" er en rettkjedet, mettet hydrokarbongruppe med formel $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$. Eksempler på et C_1 – C_{10} alkylen omfatter metylen, etylen, propylen, butylen, pentylen, heksylen, heptylen, ocytylen, nonylen og dekalen.

Med "alkenylen" menes en umettet, forgrenet eller rettkjedet eller syklisk hydrokarbongruppe på 2–18 karbonatomer med to monovalente gruppesentre avledet av fjerning av to hydrogenatomer fra den samme eller to forskjellige karbonatomer i et moralken. Typiske alkenylengrupper omfatter blant annet: 1,2-etylen ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

Med "alkynylen" menes en umettet, forgrenet eller rettkjedet eller syklisk hydrokarbongruppe på 2–18 karbonatomer med to monovalente gruppesentre avledet av fjerning av to hydrogenatomer fra den samme eller to forskjellige karbonatomer i et moralkyn. Typiske alkynylengrupper omfatter blant annet: acetylen ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), propargyl ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$) og 4-pentynyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$).

Et "arylen" er en arylgruppe som har to kovalente bindinger og kan være i orto-, meta- eller parakonfigurasjonene som angitt i følgende strukturer:



hvor fenylgruppen kan være usubstituert eller substituert med opp til fire grupper omfattende blant annet $-C_1-C_8$ alkyl, $-O-(C_1-C_8 \text{ alkyl})$, $-aryl$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-halogen$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ og $-CN$, hvor R' i hvert tilfelle er uavhengig valgt fra H , $-C_1-C_8$ alkyl og aryl.

Med "arylalkyl" menes en asyklisk alkylgruppe hvor ett av hydrogenatomene som binder til et karbonatom, vanligvis et terminal- eller sp^3 -karbonatom, utbyttes med en arylgruppe. Typiske arylalkylgrupper omfatter blant annet benzyl, 2-fenyletan-1-yl, 2-fenyleten-1-yl, naftylmetyl, 2-naftyletan-1-yl, 2-naftyleten-1-yl, naftobenzyl, 2-naftofenyletan-1-yl og lignende. Arylalkylgruppen omfatter 6 til 20 karbonatomer, f.eks. alkylenheten, herunder alkanyl-, alkenyl- eller alkynylgrupper, idet arylalkylgruppen er 1 til 6 karbonatomer og arylenheten er 5 til 14 karbonatomer.

Med "heteroarylalkyl" menes en asyklisk alkylgruppe hvor ett av hydrogenatomene som binder til et karbonatom, vanligvis et terminal- eller sp^3 -karbonatom, utbyttes med en arylgruppe. Typiske heteroarylalkylgrupper omfatter blant annet 2-benzimidazolymetyl, 2-furyletyl og lignende. Heteroarylalkylgruppen omfatter 6 til 20 karbonatomer, f.eks. alkylenheten, herunder alkanyl-, alkenyl- eller alkynylgrupper, idet heteroarylalkylgruppen er 1 til 6 karbonatomer og heteroarylenheten er 5 til 14 karbonatomer og 1 til 3 heteroatomer valgt fra N , O , P og S . Heteroarylenheten for heteroarylalkylgruppen kan være en monoring med 3 til 7 ringmedlemmer (2 til 6 karbonatomer eller en biring med 7 til 10 ringmedlemmer (4 til 9 karbonatomer og 1 til 3 heteroatomer valgt fra N , O , P og S), f.eks.: et bisyklo[4,5]-, [5,5]-, [5,6]- eller [6,6]-system.

Med "prolegemiddel" menes som anvendt i denne søknaden en forløper for eller avledet form av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som kan være mindre cytotoxisk overfor celler sammenlignet med morforbindelsen eller legemiddelet, og som kan bli enzymatisk eller hydrolytisk aktivert eller omdannet til den mer aktive morformen. Se f.eks. Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, s. 375–382, 615th Meeting Belfast (1986) og Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), s. 247–

267, Humana Press (1985). Prolegemidlene ifølge denne oppfinnelse omfatter blant annet fosfatholdige prolegemidler, tiofosfatholdige prolegemidler, sulfatholdige prolegemidler, peptidholdige prolegemidler, D-aminosyremodifiserte prolegemidler, glykosylerte prolegemidler, β -laktamholdige prolegemidler, eventuelt substituerte fenoksyacetamidholdige prolegemidler, eventuelt substituerte fenylacetamidholdige prolegemidler, 5-fluorcytosin- og andre 5-fluoruridinprolegemidler som kan omdannes til det mer aktive cytotoksiske frie legemiddelet. Eksempler på cytotoksiske legemidler som kan avledes til en prolegemiddelform for anvendelse i denne oppfinnelse, omfatter
 5
 10 blant annet forbindelser ifølge oppfinnelsen og kjemoterapeutiske stoffer slik som beskrevet ovenfor.

Med "metabolitt" menes et produkt produsert gjennom metabolisme i kroppen av en spesifisert forbindelse eller et salt derav. Metabolitter av en forbindelse kan
 15 identifiseres ved hjelp av rutineteknikker som er kjent i teknikken, og deres aktiviteter kan bestemmes ved hjelp av tester slik som dem beskrevet heri. Slike produkter kan være et resultat av for eksempel oksidering, reduksjon, hydrolyse, amidering, deamidering, esterifisering, deesterifisering, enzymatisk spalting og lignende av den tilførte forbindelsen. Oppfinnelsen omfatter følgelig
 20 metabolitter av forbindelser ifølge oppfinnelsen, herunder forbindelser produsert i en prosess omfattende opprettelse av kontakt mellom en forbindelse ifølge denne oppfinnelse og et pattedyr over en tilstrekkelig tidsperiode til å gi et metabolsk produkt derav.

25 Et "liposom" er en liten vesikkel sammensatt av forskjellige typer lipider, fosfolipider og/eller surfaktanter som er nyttige for tilførsel av et legemiddel til et pattedyr. Liposomets komponenter er vanligvis ordnet i en tosjiktsformasjon lik lipidarrangementet av biologiske membraner.

30 Med "linker" menes en kjemisk enhet omfattende en kovalent binding eller en kjede av atomer som kovalent binder et antistoff til en legemiddelenhet. I forskjellige utførelsesformer omfatter linkere en divalent gruppe slik som en alkyldiyl, en aryldiyl, en heteroaryldiyl, enheter slik som: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, gjentakende enheter av alkyloksi (f.eks. polyetylenoksi, PEG, polymetylenoksi)
 35 og alkylamino (f.eks. polyetylenamino, Jeffamine™), og diacidester og amider omfattende sukkinat, sukkinamid, diglykolat, malonat og kaproamid.

Med "kiral" menes molekyler som er ulike sin speilbildepartner, mens det med "akiral" menes molekyler som er like sin speilbildepartner.

- 5 Med "stereoisomer" menes forbindelser som har identisk kjemisk konstitusjon, men som er forskjellige med hensyn til romarrangementet av atomer eller grupper.

Med "diastereomer" menes en stereoisomer som har to eller flere kirale sentre, og hvor molekyler ikke er speilbilder av hverandre. Diastereomerer har forskjellige fysiske egenskaper, f.eks. smeltepunkt, kokepunkt, spektralegenskaper og reaktiviteter. Blandinger av diastereomerer kan separeres under analytiske høyoppløsningsprosedyrer slik som elektroforese og kromatografi.

15

Med "enantiomer" menes stereoisomerer av en forbindelse som er ulike speilbilder av hverandre.

Heri anvendte stereokjemiske definisjoner og konvensjoner følger alminneligvis S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York og Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Mange organiske forbindelser foreligger i optisk aktive former, dvs. de har evnen til å rotere planet av planpolarisert lys. Ved beskrivelse av en optisk aktiv forbindelse anvendes prefiksene D og L, eller R og S for å betegne molekylets absolutte konfigurasjon rundt dets kirale sentre. Prefiksene d og l eller (+) og (-) benyttes til å angi forbindelsens rotasjonstegn for planpolarisert lys, hvor (-) eller l betyr at forbindelsen er levorotatorisk. En forbindelse med prefikset (+) eller d er dekstrorotatorisk. For en bestemt kjemisk struktur er disse stereoisomerene identiske, med unntak av at de er speilbilder av hverandre. En spesifikk stereoisomer kan også betegnes en enantiomer, og en blanding av slike isomerer kalles ofte en enantiomerisk blanding. En 50 : 50 blanding av enantiomerer betegnes en racemisk blanding eller et racemat, som kan oppstå hvor det ikke finnes noen stereoseleksjon eller stereospesifisitet i en kjemisk reaksjon eller prosess. Med "racemisk blanding" og "racemat" menes en ekvimolar blanding av to enantiomeriske arter, frie for optisk aktivitet.

Med "tautomer" eller "tautomerisk form" menes strukturelle isomerer med forskjellig energi som er interkonvertible via en energisvak barriere. Protontautomerer (også kjent som prototropiske tautomerer) omfatter for eksempel interkonverteringer via migrering av et proton, slik som isomeriseringer av keto-enol og imin-enamin. Valenstautomerer omfatter interkonverteringer ved reorganisering av noen av bindingselektronene.

Med "farmasøytisk akseptabelt salt" menes som anvendt heri farmasøytisk akseptable organiske eller uorganiske salter av en forbindelse ifølge oppfinnelsen. Eksempler på salter omfatter blant annet salter av sulfat, citrat, acetat, oksalat, klorid, bromid, jodid, nitrat, bisulfat, fosfat, syrefosfat, isonikotinat, laktat, salicylat, syrecitrat, tartrat, oleat, tannat, pantotenat, bitartrat, askorbat, sukkinat, maleat, gentisinat, fumarat, glukonat, glukuronat, sakkarat, format, benzoat, glutamat, metanesulfonat "mesylat", etansulfonat, benzensulfonat, *p*-toluensulfonat og pamoat (dvs. 1,1'-metylen-bis(2-hydroksy-3-naftoat)). Et farmasøytisk akseptabelt salt kan omfatte inkludering av et annet molekyl slik som et acetation, et sukkination eller et annet motion. Motionet kan være en hvilken som helst organisk eller inorganisk enhet som stabiliserer ladningen på morforbindelsen. Et farmasøytisk akseptabelt salt kan videre ha mer enn ett ladet atom i sin struktur. Tilfeller hvor flere ladde atomer er del av det farmasøytisk akseptable saltet, kan ha flere motioner. Et farmasøytisk akseptabelt salt kan således ha ett eller flere ladde atomer og/eller ett eller flere motioner.

Hvis forbindelsen ifølge oppfinnelsen er en base, kan det ønskede farmasøytisk akseptable saltet fremstilles av en hvilken som helst egnet fremgangsmåte som er tilgjengelig i teknikken, f.eks. behandling av den frie basen med en inorganisk syre, slik som saltsyre, hydrobromidsyre, svovelsyre, salpetersyre, metansvovelsyre, fosforsyre og lignende, eller med en organisk syre, slik som eddiksyre, trifluoreddiksyre, maleinsyre, ravsyre, mandelsyre, fumarsyre, malonsyre, pyrodruesyre, oksalsyre, glykolsyre, salisylsyre, en pyranosidylsyre, slik som glukuronsyre eller galakturonsyre, en alfahydroksysyre, slik som sitronsyre eller tartarsyre, en aminosyre, slik som asparaginsyre eller glutaminsyre, en aromatisk syre, slik som benzosyre eller kanelsyre, en sulfonsyre, slik som *p*-toluensulfonsyre eller etansulfonsyre eller lignende.

Hvis forbindelsen ifølge oppfinnelsen er en syre, kan det ønskede farmasøytisk akseptable saltet fremstilles ved en hvilken som helst egnet fremgangsmåte, f.eks. behandling av den frie syren med en inorganisk eller organisk base, slik
 5 som et amin (primært, sekundært eller tertiært), et alkalimetallhydroksid eller jordalkalimetallhydroksid eller lignende. Illustrative eksempler på egnede salter omfatter blant annet organiske salter avledet av aminosyrer, slik som glycin og arginin, ammoniakk, primære, sekundære og tertiære aminer, og sykliske aminer, slik som piperidin, morfolin og piperazin, og inorganiske salter avledet
 10 av natrium, kalsium, kalium, magnesium, mangan, jern, kobber, sink, aluminium og litium.

Med "farmasøytisk akseptabel" menes at stoffet eller sammensetningen må være kompatibelt kjemisk og/eller toksikologisk med de andre ingrediensene
 15 omfattende en formulering, og/eller pattedyret som skal behandles dermed.

Med "solvat" menes en assosiasjon eller et kompleks av ett eller flere løsemiddelmolekyler og en forbindelse ifølge oppfinnelsen. Eksempler på løsemidler som danner solvater, omfatter blant annet vann, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, etylacetat, eddiksyre og etanolamin. Med "hydrat" menes
 20 komplekset hvor løsemiddelmolekylet er vann.

Med "beskyttelsesgruppe" menes en substituent som vanligvis benyttes til å blokkere eller beskytte en bestemt funksjonalitet, mens den omsetter andre
 25 funksjonelle grupper på forbindelsen. En "aminobeskyttelsesgruppe" er for eksempel en substituent bundet til en aminogruppe som blokkerer eller beskytter aminofunksjonaliteten i forbindelsen. Egnede aminobeskyttelsesgrupper omfatter acetyl, trifluoracetyl, t-butoksykarbonyl (BOC), benzyloksykarbonyl (CBZ) og 9-fluorenylmetylenoksykarbonyl (Fmoc).
 30 Med en "hydroksybeskyttelsesgruppe" menes likeledes en substituent av en hydroksygruppe som blokkerer eller beskytter hydroksyfunksjonaliteten. Egnede beskyttelsesgrupper omfatter acetyl og silyl. Med "karboksybeskyttelsesgruppe" menes en substituent av karboksygruppen som blokkerer eller beskytter karboksyfunksjonaliteten. Vanlige karboksybeskyttelsesgrupper omfatter
 35 fenylsulfonyletyl, cyanoetyl, 2-(trimetylsilyl)etyl, 2-(trimetylsilyl)etoksymetyl, 2-(p-toluensulfonyl)etyl, 2-(p-nitrofenylsulfonyl)etyl, 2-(difenylfosfino)-etyl,

nitroetyl og lignende. En generell beskrivelse av beskyttelsesgrupper og deres anvendelse finnes i T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

- 5 Med "fraspaltelig gruppe" menes en funksjonell gruppe som kan substitueres med en annen funksjonell gruppe. Visse fraspaltelige grupper er velkjent i teknikken, og eksempler omfatter blant annet et halid (f.eks. klorid, bromid, jodid), metansulfonyl(mesyl), p-toluensulfonyl(tosyl), trifluormetylsulfonyl(triflat) og trifluormetylsulfonat.

10 **Forkortelser**

LINKERKOMPONENTER:

MC = 6-maleimidokaproyl

- 15 Val-Cit eller "vc" = valincitrullin (et eksempeldipeptid i en proteasespaltbar linker)

Citrullin = 2-amino-5-ureidopentansyre

PAB = p-aminobenzyloksykarbonyl (et eksempel på en "selvimmolativ" linkerkomponent)

- 20 Me-Val-Cit = N-metyl-valincitrullin (hvor linkerpeptidbindingen er modifisert for å forebygge spalting av cathepsin B)

MC(PEG)6-OH = maleimidokaproyl-polyetylenglykol (kan være bundet til antistoffcysteiner).

CYTOTOKSISKE LEGEMIDLER:

MMAE = mono-metylauristatin E (MW 718)

- 25 MMAF = variant av auristatin E (MMAE) med et fenylalanin i C-terminalen av legemiddelet (MW 731,5)

MMAF-DMAEA = MMAF med DMAEA (dimetylamoetylamin) i en amidbinding til det C-terminale fenylalaninet (MW 801,5)

MMAF-TEG = MMAF med tetraetylglykol esterifisert til fenylalaninet

MMAF-NtBu = N-t-butyl, bundet som et amid til C-terminalen av MMAF

5 DM1 = N(2')-deacetyl-N(2')-(3-merkpto-1-oksopropyl)-maytansin

DM3 = N(2')-deacetyl-N2-(4-merkpto-1-oksopentyl)-maytansin

DM4 = N(2')-deacetyl-N2-(4-merkpto-4-metyl-1-oksopentyl)-maytansin

Ytterligere forkortelser er som følger: AE er auristatin E, Boc er *N*-(*t*-butoksykarbonyl), cit er citrullin, dap er dolaprin, DCC er 1,3-disykloheksylkarbodiimid, DCM er diklorometan, DEA er dietylamin, DEAD er dietylazodikarboksylat, DEPC er dietylfosforylcyanidat, DIAD er diisopropylazodikarboksylat, DIEA er *N,N*-diisopropyletylamin, dil er dolaisoleucin, DMA er dimetylacetamid, DMAP er 4-dimetylaminopyridin, DME er etylenglykoldimetyleter (eller 1,2-dimetoksyetan), DMF er *N,N*-dimetylformamid, DMSO er dimetylsulfoksid, doe er dolafenin, dov er *N,N*-dimetylvalin, DTNB er 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzosyre), DTPA er dietylntriaminpentaeddiksyre, DTT er ditiotreitol, EDCI er 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimidhydroklorid, EEDQ er 2-etoksy-1-etoksykarbonyl-1,2-dihydroquinolin, ES-MS er elektropraymassespektrometri, EtOAc er etylacetat, Fmoc er *N*-(9-fluorenylmetoksykarbonyl), gly er glycin, HATU er *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroniumheksafluorofosfat, HOBt er 1-hydroksybenzotriazol, HPLC er høytrykksvæskekromatografi, ile er isoleucin, lys er lysin, MeCN (CH₃CN) er acetonitril, MeOH er metanol, Mtr er 4-anisyldifenylmetyl (eller 4-metoksytrityl), nor er (1*S*, 2*R*)-(+)-norefedrin, PBS er fosfatbufret saltløsning (pH 7,4), PEG er polyetylglykol, Ph er fenyl, Pnp er p-nitrofenyl, MC er 6-maleimidokaproyl, phe er L-fenylalanin, PyBrop er brom-*tris*-pyrrolidinofosfoniumheksafluorofosfat, SEC er kromatografi med størrelseseksklusjon, Su er sukkinimid, TFA er trifluoreddiksyre, TLC er tynnsljikt-kromatografi, UV er ultrafiolett, og val er valin.

Med en "fri cysteinaminosyre" menes en cysteinaminosyreenhet som er konstruert til et morantistoff, har en tiolfunksjonsgruppe (-SH), og ikke er paret som en intramolekulær eller intermolekulær disulfidbro.

- 5 Med "tiolreaktivitetsverdi" menes en kvantitativ karakterisering av reaktiviteten av frie cysteinaminosyrer. Tiolreaktivitetsverdien er den prosenten av en fri cysteinaminosyre i et cysteinkonstruert antistoff som reagerer med et tiolreaktivt reagens, og omdannet til en største verdi på 1. En fri cysteinaminosyre på et cysteinkonstruert antistoff som reagerer i 100 % utbytte med et tiolreaktivt reagens, slik som et biotinmaleimidreagens, for å danne et biotinmerket antistoff, har for eksempel en tiolreaktivitetsverdi på 1,0. En annen cysteinaminosyre konstruert til det like eller ulike morantistoffet som reagerer i 80 % utbytte med et tiolreaktivt reagens, har en tiolreaktivitetsverdi på 0,8. En annen cysteinaminosyre konstruert til det like eller ulike morantistoffet som ikke i det hele tatt reagerer med et tiolreaktivt reagens, har en tiolreaktivitetsverdi på 0. Bestemmelse av tiolreaktivitetsverdien for et bestemt cystein kan gjennomføres ved ELISA-assay, massespektroskopi, væskekromatografi, autoradiografi eller andre kvantitative analytiske tester.
- 20 Et "morantistoff" er et antistoff omfattende en aminosyresekvens hvorfra én eller flere aminosyreenheter utbyttes med én eller flere cysteinenheter. Morantistoffet kan omfatte en naturlig forekommende sekvens eller villtype-sekvens. Morantistoffet kan ha preeksisterende aminosyresekvensmodifikasjoner (slik som insersjoner, delesjoner og/eller substitusjoner) i forhold til andre naturlig forekommende eller modifiserte former eller villtype-former av et antistoff. Et morantistoff kan være rettet mot et målantigen av interesse, f.eks. et biologisk viktig polypeptid. Antistoffer rettet mot ikke-polypeptidantigener (slik som tumorassosierte glykolipidantigener, se US 5091178) behandles også.
- 25

Table 1

```

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

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

```

Table 1 (cont')

```

/*
*/
#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 jumps */
};

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              *xhm;          /* 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();

```

Table 1 (cont')

```

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

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

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

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

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

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

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

```

main

Table 1 (cont')

```

/* 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.
 */
nwt)
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int       *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;               /* score for each type */
    int       ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register   id;               /* diagonal index */
    register   ij;               /* jmp index */
    register   *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;           /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

Table 1 (cont')

```

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

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

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

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

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

```

...nw

Table 1 (cont')

```

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

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

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

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

```

Table 1 (cont')

```

/*
 *
 * 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()
 * numst() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a sequence
 */

#include "nw.h"

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

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

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

    if ((fx = fopen(outfile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, outfile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], lcn0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = lcn0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (lcn1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (lcn0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

Table 1 (cont')

```

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

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

```

getmat

Table 1 (cont')

```

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

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

        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

Table 1 (cont')

```

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

```

...pr_align

dumpblock

Table 1 (cont')**...dumpblock**

```

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

```

nums**putline**

Table 1 (cont')

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

    if (!*out[0] || (*out[0] == '.' && *(p0[0]) == '.') ||
        !*out[1] || (*out[1] == '.' && *(p1[1]) == '.'))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = '.';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

stars

Table 1 (cont')

```

/*
 * 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));
}

```

stripname

Table 1 (cont')

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- 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: nwt()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

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

```

cleanup**getseq**

Table 1 (cont')

```

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

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

```

...getseq

g_calloc

readjmps

Table 1 (cont')**...readjumps**

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && tj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1 */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jumps */
for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (tj) {
    (void) unlink(jname);
    tj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Table 1 (cont')

```

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

    char    *mktemp();

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

```

III. Sammensetninger og fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen

Oppfinnelsen stiller til rådighet anti-CD79b-antistoffer eller funksjonelle fragmenter derav, og deres anvendelse til fremgangsmåter for behandling av hematopoietiske tumorer.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff som binder, fortrinnsvis spesifikt, til et hvilket som helst av de ovenfor eller nedenfor beskrevne polypeptidene, som definert i patentkravene. Antistoffet er eventuelt et monoklonalt antistoff, et antistofffragment, herunder et Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragment, et diastoff, et antistoff med ett domene, et kimært antistoff, et humanisert antistoff, et enkjedet antistoff eller et antistoff som kompetitivt inhiberer bindingen av et anti-CD79b-polypeptidantistoff til dets respektive antigene epitop. Antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelse kan eventuelt konjugeres til et vekstinhiberende stoff eller cytotoxisk stoff, slik som et toksin, herunder for eksempel et auristatin, et maytansinoid, et dolostatinderivat eller en kalicheamicin, et antibiotikum, en radioaktiv isotop, et nukleolytisk enzym eller lignende. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan eventuelt produseres i CHO-celler eller bakterieceller og fortrinnsvis indusere døden for en celle hvortil de binder. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan i sammenheng med påvisning være påvisbart merket, bundet til en fast fase eller lignende.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets monovalente affinitet for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b) er i det vesentlige den samme som den monovalente affiniteten til et murint antistoff (f.eks. det murine antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b) eller et kimært antistoff (f.eks. det kimære antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b), omfattende, bestående av eller bestående i det vesentlige av et variabelt domenes sekvens i den lette kjede og tunge kjede som angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14).

10

Også beskrevet heri er et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets monovalente affinitet for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b) er lavere, f.eks. minst 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 eller 60 ganger lavere, enn den monovalente affiniteten til et murint antistoff (f.eks. det murine antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b) eller et kimært antistoff (f.eks. det kimære antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b), omfattende, bestående av eller bestående i det vesentlige av et variabelt domenes sekvens i den lette kjede og tunge kjede som angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14).

20

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets monovalente affinitet for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b) er større, f.eks. minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 ganger større, enn den monovalente affiniteten til et murint antistoff (f.eks. det murine antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b) eller et kimært antistoff (f.eks. det kimære antistoffets affinitet som et Fab-fragment for CD79b), omfattende, bestående av eller bestående i det vesentlige av et variabelt domenes sekvens i den lette kjede og tunge kjede som angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14).

25

30

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) i det vesentlige er den sammen som affiniteten til et murint antistoff (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) eller et kimært antistoff (f.eks. det kimære antistoffets affinitet som et Fab-fragment for

35

CD79b) i dets bivalente form, omfattende, bestående av eller bestående i det vesentlige av et variabelt domenes sekvens i den lette kjede og tunge kjede som angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14).

5 Også beskrevet heri er et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er lavere, f.eks. minst 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 eller 60 ganger lavere, som affiniteten til et murint antistoff (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for
10 CD79b) eller et kimært antistoff (f.eks. det kimære antistoffets affinitet som et IgG-fragment for CD79b) i dets bivalente form, omfattende, bestående av eller bestående i det vesentlige av et variabelt domenes sekvens i den lette kjede og tunge kjede som angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14).

15

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er større, f.eks. minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 ganger større, enn affiniteten til et murint antistoff (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) eller et kimært antistoff (f.eks. det
20 kimære antistoffets affinitet som et IgG-fragment for CD79b) i dets bivalente form, omfattende, bestående av eller bestående i det vesentlige av et variabelt domenes sekvens i den lette kjede og tunge kjede som angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14).

25

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er 0,4 nM. I et ytterligere aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor
30 antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er 0,4 nM +/-0,04.

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,3 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor
35

antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,32 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,36 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,4 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,44 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,48 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,5 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,3 nM og 0,5 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,32 nM og 0,48 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,36 nM og 0,44 nM.

25

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er 0,2 nM. I et ytterligere aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er 0,2 nM $\pm$ 0,02.

30

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG til CD79b) er minst 0,1 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor

35

[illegible]

affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,16 nM og 0,24 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,18 nM og 0,22 nM.

5

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er 0,5 nM. I et ytterligere aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er 0,5 nM +/-0,1.

10

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,4 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,5 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,6 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er minst 0,7 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,3 nM og 0,7 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,4 nM og 0,6 nM. I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert anti-CD79b-antistoff hvor antistoffets affinitet i dets bivalente form for CD79b (f.eks. antistoffets affinitet som et IgG for CD79b) er mellom 0,5 nM og 0,55 nM.

15

20

25

30

35

I et aspekt er det murine antistoffets monovalente affinitet for CD79b i det vesentlige den samme som bindingsaffiniteten til et Fab-fragment omfattende et variabelt domenes sekvenser av SEQ ID NO: 10 (figur 7A-B) og SEQ ID NO: 14

(figur 8A–B). I et annet aspekt er det murine antistoffets monovalente affinitet for CD79b i det vesentlige den samme som bindingsaffiniteten til et Fab-fragment omfattende et variabelt domenes sekvenser i et antistoff dannet av hybridom deponert hos ATCC som HB11413 20. juli 1993 eller kimært antistoff
 5 omfattende de variable domenene i antistoff dannet av hybridomer deponert hos ATCC som HB11413 20. juli 1993.

Som veletablert i teknikken kan en ligands bindingsaffinitet for sin reseptor bestemmes ved hjelp av et hvilket som helst av en rekke assayer, og uttrykkes i
 10 form av en rekke kvantitative verdier. I en utførelsesform er bindingsaffiniteten følgelig uttrykt som Kd-verdier og gjenspeiler egen bindingsaffinitet (f.eks. med begrensede aviditetsvirkninger). Bindingsaffinitet måles alminneligvis og fortrinnsvis *in vitro*, enten i en cellefri eller celleassosiert situasjon. Som beskrevet i større detalj heri kan foldeforskjeller i bindingsaffinitet kvantifiseres
 15 med hensyn til forholdet mellom den monovalente bindingsaffinitetsverdien til et humanisert antistoff (f.eks. i Fab-form) og den monovalente bindingsaffinitetsverdien til et referanse-/komparatorantistoff (f.eks. i Fab-form) (f.eks. et murint antistoff med donorsekvenser i de hypervariable regionene), hvor bindingsaffinitetsverdiene bestemmes under lignende assaybetingelser. I en
 20 utførelsesform er foldeforskjellen i bindingsaffinitet således bestemt som forholdet mellom Kd-verdiene til det humaniserte antistoffet i Fab-form og nevnte Fab-referanse-/komparatorantistoff. I en utførelsesform, hvis et antistoff ifølge oppfinnelsen (A) for eksempel har en affinitet som er "3 ganger lavere" enn affiniteten til et referanseantistoff (M), og hvis Kd-verdien for A er 3x, ville
 25 Kd-verdien for M være 1x, og forholdet mellom Kd for A og Kd for M ville være 3 : 1. I en utførelsesform, hvis et antistoff ifølge oppfinnelsen (C) omvendt har en affinitet som er "3 ganger større" enn affiniteten til et referanseantistoff (R), og hvis Kd-verdien for C er 1x, ville Kd-verdien for R være 3x, og forholdet mellom Kd for C og Kd for R ville være 1 : 3. Et hvilket som helst av et antall
 30 assayer som er kjent i teknikken, herunder dem beskrevet heri, kan anvendes til å oppnå bindingsaffinitetsmålinger, herunder for eksempel Biacore, radioimmunassay (RIA) og ELISA.

Beskrevet heri er et antistoff som binder til CD79b, hvilket antistoff omfatter:

35 a) minst én, to, tre, fire, fem eller seks HVR-er valgt fra gruppen bestående av:

- i) HVR-L1 omfattende sekvens A1–A15, hvor A1–A15 er KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)
- ii) HVR-L2 omfattende sekvens B1–B7, hvor B1–B7 er AASNLES (SEQ ID NO: 132)
- 5 iii) HVR-L3 omfattende sekvens C1–C9, hvor C1–C9 er QQSNEPDLT (SEQ ID NO: 133)
- iv) HVR-H1 omfattende sekvens D1–D10, hvor D1–D10 er GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)
- v) HVR-H2 omfattende sekvens E1–E18, hvor E1–E18 er
- 10 GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) og
- vi) HVR-H3 omfattende sekvens F1–F10, hvor F1–F10 er TRRVVPYFDY (SEQ ID NO: 136).

- I en utførelsesform omfatter HVR-L1 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 131.
 I en utførelsesform omfatter HVR-L2 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 132.
 15 I en utførelsesform omfatter HVR-L3 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 133.
 I en utførelsesform omfatter HVR-H1 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 134.
 I en utførelsesform omfatter HVR-H2 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 135.
 I en utførelsesform omfatter HVR-H3 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 136.
 I en utførelsesform er et antistoff omfattende disse sekvensene (i kombinasjon
 20 som beskrevet heri) humanisert eller humant.

Også beskrevet er et antistoff som binder til CD79b, hvilket antistoff omfatter:

- a) minst én, to, tre, fire, fem eller seks HVR-er valgt fra gruppen bestående av:
- 25 i) HVR-L1 omfattende sekvens A1–A15, hvor A1–A15 er KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)
- ii) HVR-L2 omfattende sekvens B1–B7, hvor B1–B7 er AASNLES (SEQ ID NO: 132)

iii) HVR-L3 omfattende sekvens C1–C9, hvor C1–C9 er QQSNEEDPLT (SEQ ID NO: 133)

iv) HVR-H1 omfattende sekvens D1–D10, hvor D1–D10 er GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

5 v) HVR-H2 omfattende sekvens E1–E18, hvor E1–E18 er GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) og

vi) HVR-H3 omfattende sekvens F1–F10, hvor F1–F10 er TRRVVPVYFDY (SEQ ID NO: 136). 136), og

10 b) minst én HVR-variant, hvor HVR-sekvensvarianten omfatter modifikasjon av minst én enhet av sekvensen angitt i SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 eller 136. I en utførelsesform omfatter HVR-L1 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 131. I en utførelsesform omfatter HVR-L2 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 132. I en utførelsesform omfatter HVR-L3 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 133. I en utførelsesform omfatter HVR-H1 i
15 antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 134. I en utførelsesform omfatter HVR-H2 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 135. I en utførelsesform omfatter HVR-H3 i antistoffet sekvensen av SEQ ID NO: 136. I en utførelsesform er et antistoff omfattende disse sekvensene (i kombinasjon som beskrevet heri) humanisert eller humant.

20

Søknaden beskriver et antistoff omfattende én, to, tre, fire, fem eller seks HVR-er, hvor hver HVR omfatter, består av eller består i det vesentlige av en sekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 og 136, og hvor SEQ ID NO: 131 tilsvarer en HVR-L1, SEQ ID NO: 132 tilsvarer HVR-L2,
25 SEQ ID NO: 133 tilsvarer en HVR-L3, SEQ ID NO: 134 tilsvarer en HVR-H1, SEQ ID NO: 135 tilsvarer en HVR-H2, og SEQ ID NO: 136 tilsvarer en HVR-H3. Antistoffet ifølge oppfinnelsen kan omfatte HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, hvor hver enkelt i rekkefølge omfatter SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 og 136. Antistoffvarianter ifølge den foreliggende
30 oppfinnelsen er som definert i kravene.

HVR-varianter i et antistoff kan ha modifikasjoner av én eller flere enheter i HVR-en. I en utførelsesform omfatter en HVR-L1-variant én substitusjon i følgende posisjoner: A4 (K), A9 (E eller S) og A10 (A eller S). I en utførelsesform omfatter en HVR-L2-variant 1–5 (1, 2, 3, 4, eller 5) substitusjoner i en hvilken

5 som helst eller kombinasjon av følgende posisjoner: B2 (S eller G), B3 (R eller G), B4 (K, R, Y, I, H eller Q), B5 (R), B6 (G, K, A, R, S eller L) og B7 (R, N, T eller G). I en utførelsesform omfatter en HVR-L3-variant 1–4 (1, 2, 3 eller 4) substitusjoner i en hvilken som helst eller kombinasjon av følgende posisjoner: C1 (N eller D), C2 (N eller P), C3 (D eller R), C5 (S, K, A, Q, D, L eller G), C6 (A,

10 E eller N), C7 (A), C8 (R) og C9 (N). I en utførelsesform omfatter en HVR-H1-variant 1–7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7) substitusjon i en hvilken som helst eller kombinasjon av følgende posisjoner: D1 (P), D2 (F), D3 (P, S, Y, G eller N), D4 (L eller V), D5 (T, R, N, K, C, G eller P), D6 (R, T, K eller G), D8 (F), D9 (V OR L) og D10 (S, Q, N eller D). I en utførelsesform omfatter en HVR-H3-variant 1–3

15 (1, 2 eller 3) substitusjoner i en hvilken som helst eller kombinasjon av følgende posisjoner: F4 (R eller I), F6 (I eller F), F7 (K, C, R, V eller F), F8 (L) og F9 (S). Bokstaver i parentes etter hver posisjon angir en illustrativ substitusjonsamino-syre (dvs. utbytting); som ville være åpenbart for en fagperson, kan andre aminosyrers egnethet som substitusjonsamino-syrer i

20 sammenhengen beskrevet heri rutinemessig vurderes ved hjelp av teknikker kjent i teknikken og/eller beskrevet heri. I en utførelsesform er A9 i en HVR-L1-variant E. I en utførelsesform er F6 i en HVR-H3-variant I. I en utførelsesform er F7 i en HVR-H3-variant R. I en utførelsesform er F8 i en HVR-H3-variant L. I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-H3-variant hvor F6 er I, F7 er R og

25 F8 er L. I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-L1-variant hvor A9 er E og en HVR-H3-variant hvor F6 er I, F7 er R og F8 er L. I en utførelsesform er A9 i en HVR-L1-variant S. I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-L1-variant hvor A9 er S og en HVR-H3-variant hvor F6 er I, F7 er R og F8 er L.

30

I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-L1-variant hvor A4 er K. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L1-variant HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3 hvor hver enkelt i rekkefølge omfatter sekvensen angitt i SEQ ID NO: 132, 133, 134, 135 og 136. I noen utførelsesformer omfatter nevnte

35 HVR-L1-antistoffvariant videre en HVR-L1-variant hvor A9 er E eller S og/eller A10 er A eller S. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L1-

antistoffvariant videre en HVR-L3-variant hvor C6 er E eller N og/eller C7 er A. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene videre en human undergruppe III-strukturkonsensussekvens i den tunge kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter strukturkonsensussekvensen substitusjon ved posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen fra substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 og/eller 80. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede) 48 I, 67 er A, 69 er F, 71 er A, 73 er T, 75 er S, 78 er A og/eller 80 er M. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F.

I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-L2-variant hvor B3 er R, B4 er K, B6 er G og B7 er R. I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-L2-variant hvor B3 er R, B4 er Y, B6 er K og B7 er R. I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-L2-variant hvor B3 er R B4 er K og B6 er G. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L2-antistoffvariant videre HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3 hvor hver enkelt i rekkefølge omfatter sekvensen angitt i SEQ ID NO: 131, 133, 134, 135 og 136. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L2-antistoffvariant videre en HVR-L1-variant hvor A9 er E eller S og/eller A10 er A eller S. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L2-antistoffvariant videre en HVR-L3-variant hvor C6 er E eller N og/eller C7 er A. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene videre en human undergruppe III-strukturkonsensussekvens i den tunge kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter strukturkonsensussekvensen

substitusjon ved posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I en utførelsesform for disse antistoffer omfatter disse antistoffer videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 og/eller 80. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede) 48 I, 67 er A, 69 er F, 71 er A, 73 er T, 75 er S, 78 er A og eller 80 er M. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F.

I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-L3-variant hvor C5 er K. I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-L3-variant hvor C5 er S. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L3-antistoffvariant videre HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3 hvor hver enkelt i rekkefølge omfatter sekvensen angitt i SEQ ID NO: 131, 132, 134, 135 og 136. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L3-antistoffvariant videre en HVR-L1-variant hvor A9 er E eller S og/eller A10 er A eller S. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-L3-antistoffvariant videre en HVR-L3-variant hvor C6 er E eller N og/eller C7 er A. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene videre en human undergruppe III-strukturkonsensussekvens i den tunge kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter strukturkonsensussekvensen substitusjon ved posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen fra lett kjede

substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge

5 kjede substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 og/eller 80. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede) 48 I, 67 er A, 69 er F, 71 er A, 73 er T, 75 er S, 78 er A og eller 80 er M. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-

10 strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F.

15 I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-H1-variant hvor D3 er P, D5 er T, D6 er R og D10 er N. I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-H1-variant hvor D3 er P, D5 er N, D6 er R og D10 er N. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-H1-antistoffvariant videre HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-

20 H2 og HVR-H3 hvor hver enkelt i rekkefølge sekvensen angitt i SEQ ID NO: 131, 132, 133, 135 og 136. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-H1-antistoffvariant videre en HVR-L1-variant hvor A9 er E eller S og/eller A10 er A eller S. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-H1-antistoffvariant videre en HVR-L3-variant hvor C6 er E eller N og/eller C7 er A. I noen utførelsesformer

25 omfatter disse antistoffene videre en human undergruppe III-strukturkonsensussekvens i den tunge kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter strukturkonsensussekvensen substitusjon ved posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I

30 noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F. I

35 en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede substitusjon ved posisjon 48, 67,

69, 71, 73, 75, 78 og/eller 80. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede) 48 I, 67 er A, 69 er F, 71 er A, 73 er T, 75 er S, 78 er A og eller 80 is M. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter disse antistoffene

5 videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F.

10

I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-H3-variant hvor F6 er I og F8 er L. I en utførelsesform omfatter et antistoff en HVR-H3-variant hvor F6 er I, F7 er R og F8 er L. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-H3-antistoffvariant videre HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 og HVR-H2 hvor hver enkelt i

15 rekkefølge omfatter sekvensen angitt i SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134 og 135. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-H3-antistoffvariant videre en HVR-L1-variant hvor A9 er E eller S og/eller A10 er A eller S. I noen utførelsesformer omfatter nevnte HVR-H3-antistoffvariant videre en HVR-L3-variant hvor C6 er E eller N og/eller C7 er A. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene

20 videre en human undergruppe III-strukturkonsensussekvens i den tunge kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede substitusjon ved posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede) 71 A,

25 73 er T og/eller 78 er A. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede) 48 I, 67 er A, 69 er F, 71 er A,

30 73 er T og/eller 78 er A. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I noen utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F. I

35 en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane undergruppe III-

strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 og/eller 80. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den humane undergruppe III-strukturkonsensussekvensen i den tunge kjede) 48 I, 67 er A, 69 er F, 71 er A, 73 er T, 75 er S, 78 er A og eller 80

5 er M. I noen utførelsesformer for disse antistoffene omfatter disse antistoffene videre en human κ I-strukturkonsensussekvens i den lette kjede. I en utførelsesform for disse antistoffene omfatter den humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I noen utførelsesformer for disse antistoffene er posisjon (av den

10 humane κ I-strukturkonsensussekvensen i den lette kjede) 4 L og/eller 47 er F.

Søknaden beskriver også et antistoff omfattende én, to, tre, fire, fem eller alle av HVR-sekvensene angitt på figur 9 (SEQ ID NO: 17–21) og/eller figur 10 (SEQ ID NO: 22–106).

15

Et terapeutisk stoff for anvendelse hos en vertspasient viser fortrinnsvis lite til ingen immunogen respons mot stoffet i nevnte pasient. I en utførelsesform stiller oppfinnelsen til rådighet et slikt stoff. I en utførelsesform stiller oppfinnelsen for eksempel til rådighet et humanisert antistoff som viser og/eller forventes å vise

20 en respons for humant anti-mus-antistoff (HAMA) ved et i det vesentlige redusert nivå sammenlignet med et antistoff omfattende sekvensen av SEQ ID NO: 10 og 14 i en vertspasient. I et annet eksempel stiller oppfinnelsen til rådighet et humanisert antistoff som viser og/eller forventes å vise minimal eller ingen respons for humant anti-mus-antistoff (HAMA). I et eksempel viser et

25 antistoff ifølge oppfinnelsen respons for anti-mus-antistoff som er på eller mindre enn et klinisk akseptabelt nivå.

Et humanisert antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte én eller flere humane og/eller humane konsensussekvenser (f.eks. struktur) i de ikke-hypervariable regionene i dets tunge og/eller lette kjedes variable domene. I noen

30 utførelsesformer er én eller flere ytterligere modifikasjoner til stede i de humane og/eller humane konsensussekvenser i de ikke-hypervariable regioner. I en utførelsesform omfatter den tunge kjedens variable domene i et antistoff ifølge oppfinnelsen en human konsensusrammeverksekvens, som i en utførelsesform

35 er undergruppe III-konsensusrammeverksekvensen. I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en undergruppe III-

konsensusrammeverksekvensvariant modifisert i minst én aminosyreposisjon. I en utførelsesform kan en undergruppe III-konsensusrammeverksekvensvariant for eksempel omfatte en substitusjon ved én eller flere av posisjon 71, 73 og/eller 78. I en utførelsesform er nevnte substitusjon R71A, N73T og/eller

5 L78A, i en hvilken som helst kombinasjon derav. I en utførelsesform omfatter en undergruppe III-strukturkonsensussekvensvariant i den tunge kjede for eksempel substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73 og/eller 78. I en utførelsesform er nevnte substitusjon V48I, F67A, I69F, R71A, N73T og/eller L78A. I en utførelsesform omfatter en undergruppe III-

10 strukturkonsensussekvensvariant i den tunge kjede for eksempel substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 og/eller 80. I en utførelsesform er nevnte substitusjon V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A og/eller L80M. I en utførelsesform omfatter den lette kjedens variable domene i et antistoff ifølge oppfinnelsen en human konsensusrammeverksekvens, hvilken i en

15 utførelsesform er κ I-konsensusrammeverksekvensen. I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en κ I-konsensusrammeverksekvens modifisert i minst én aminosyreposisjon. I en utførelsesform kan κ I-konsensusrammeverksekvensvariant for eksempel omfatte en substitusjon ved posisjon 4. I en utførelsesform er nevnte substitusjon M4L. I en utførelsesform

20 kan en κ I-konsensusrammeverksekvensvariant for eksempel omfatte en substitusjon ved posisjon 4 og/eller 47. I en utførelsesform er nevnte substitusjon M4L og/eller L47F.

Som kjent i teknikken, og som beskrevet i større detalj heri nedenfor, kan

25 aminosyreposisjonen/-grensen som avgrenser en hypervariabel region av et antistoff variere, avhengig av konteksten og de forskjellige definisjonene kjent i teknikken (som beskrevet nedenfor). Noen posisjoner i et variabelt domene kan ses som hybride hypervariable posisjoner ved at disse posisjonene kan anses for å være innenfor en hypervariabel region på ett sett av kriterier, mens de anses

30 for å være utenfor en hypervariabel region på et annet sett av kriterier. Én eller flere av disse posisjonene kan også finnes i utvidede hypervariable regioner (som videre definert nedenfor). Oppfinnelsen stiller til rådighet antistoffer omfattende modifikasjoner i disse hybride hypervariable posisjonene. I en utførelsesform omfatter disse hypervariable posisjonene én eller flere posisjoner

35 26–30, 33–35B, 47–49, 57–65, 93, 94 og 101–102 i en tung kjedes variable domene. I en utførelsesform omfatter disse hybride hypervariable posisjonene

én eller flere av posisjon 24–29, 35–36, 46–49, 56 og 97 i en lett kjedes variable domene. I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en human undergruppe-konsensusrammeverksekvensvariant modifisert ved én eller flere hybride hypervariable posisjoner.

5

I et aspekt omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en tung kjedes variable domene omfattende en human undergruppe III-konsensusrammeverksekvensvariant modifisert ved én eller flere av posisjon 26–30, 33–35, 48–49, 58, 60–63, 93 og 101. I en utførelsesform omfatter antistoffet en G26P-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en F27Y-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en T28P-, S-, Y-, G- eller N-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en F29L- eller F29V-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en S30T-, R-, N-, K-, C-, G- eller P-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en A33W- eller A33F-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en M34I-, V- eller L-substitusjon. I en utførelsesform S35E, Q, N eller D. I en utførelsesform omfatter antistoffet en V48I-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en S49G-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en Y58N-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en A60N-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en D61E-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en S62I-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en V63F-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en A93T-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en D101S-substitusjon.

25

I et aspekt omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en lett kjedes variable domene omfattende en human kappa-undergruppe I-konsensusrammeverksekvensvariant modifisert ved én eller flere av posisjon 24, 27–29, 56 og 97. I en utførelsesform omfatter antistoffet en R24K-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en Q27K-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en S28D- eller E-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en I29G-, A- eller S-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en S56R-, N-, T- eller G-substitusjon. I en utførelsesform omfatter antistoffet en T97N-substitusjon.

35

I et aspekt omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en tung kjedes variable domene omfattende en human undergruppe III-konsensusrammeverksekvensvariant modifisert ved 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 eller alle av posisjon 26–30, 33–35, 48–49, 58, 60–63, 93 og 101. I en utførelsesform er modifikasjonen valgt fra gruppen bestående av G26P, F27Y, T28P (S, Y, G eller N), F29L (V), S30T (R, N, K, C, G eller P), A33W (F), M34I (V eller L), S35E (Q, N eller D), V48I, S49G, Y58N, A60N, D61E, S62I, V63F, A93T og D101S. I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en undergruppe III-konsensusrammeverksekvensvariant modifisert ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 og/eller 80. I en utførelsesform er nevnte substitusjon V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A og/eller L80M.

I et aspekt omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en lett kjedes variable domene omfattende en human kappa-undergruppe I-konsensusrammeverksekvensvariant modifisert ved 1, 2, 3, 4, 5 eller alle av posisjon 24, 27–29, 56 og 97. I en utførelsesform er modifikasjonen valgt fra gruppen bestående av R24K, Q27K, S28D (E), I29G (A eller S), S56R (N, T eller G) og T97N. I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en κ I-konsensusrammeverksekvens modifisert ved posisjon 4 og/eller 47. I en utførelsesform er nevnte substitusjon M4L og/eller L47F.

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte hvilke som helst humane eller humane konsensusrammeverksekvenser i den lette kjede, forutsatt at antistoffet viser ønskede biologiske karakteristikk (f.eks. en ønsket bindingsaffinitet). I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen minst en del av (eller hele) rammeverksekvensen fra human κ -lettkjede. I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen minst en del av (eller hele) den humane κ -undergruppe I-strukturkonsensussekvensen.

I et aspekt omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en tung og/eller lett kjedes variable domene omfattende rammeverksekvens angitt i SEQ ID NO: 9 (figur 7A–B) og/eller 13 (figur 8A–B).

I et aspekt er et antistoff ifølge oppfinnelsen et humanisert anti-CD79b-antistoff konjugert til et cytotoxisk stoff. I et aspekt inhiberer det humaniserte anti-

CD79b-antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff tumorprogresjon i xenograft.

I et aspekt er både det humaniserte antistoffet og det kimære antistoffet
5 monovalente. I en utførelsesform omfatter både det humaniserte og kimære antistoffet en enkelt Fab-region bundet til en Fc-region. I en utførelsesform omfatter det kimære referanseantistoffet et variabelt domenes sekvenser angitt på figur 7A–B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A–B (SEQ ID NO: 14). 14) bundet til en human Fc-region. I en utførelsesform er den humane Fc-regionen den for et IgG
10 (f.eks. IgG1, 2, 3 eller 4).

Beskrevet heri er et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 164–166). I en utførelsesform omfatter det variable
15 domenet FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 160–163). I en utførelsesform omfatter antistoffet CH1- og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 167 og/eller 168). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 15, SEQ ID NO: 164–
20 166) og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 15, SEQ ID NO: 160–163). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 15, SEQ ID NO: 164–166) og CH1- og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 167 og/eller 168) I en utførelsesform omfatter et antistoff
25 en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 15, SEQ ID NO: 164–166) og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 15, SEQ ID NO: 160–163). 160–163) og CH1 og/eller Fc (figur 15, SEQ ID NO: 167 og/eller 168).

30 Beskrevet heri er et antistoff omfattende en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 156–158). I en utførelsesform omfatter det variable domenet FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 152–155). I en utførelsesform omfatter antistoffet CL1-sekvensen angitt på
35 figur 15 (SEQ ID NO: 159). I en utførelsesform omfatter antistoffet en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-

sekvensen (SEQ ID NO: 156–158) og FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 152–155) angitt på figur 15. I en utførelsesform omfatter et antistoff en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 156–158) og CL1-sekvensen (SEQ ID NO: 159) angitt på figur 15. I en utførelsesform omfatter et antistoff en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 156–158) og FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 152–155) angitt på figur 15, og CL1-sekvensen angitt på figur 15 (SEQ ID NO: 159).

10

Beskrevet heri er et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 183–185). I en utførelsesform omfatter det variable domenet FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 179–182). I en utførelsesform omfatter antistoffet CH1- og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 186 og/eller 187). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 16, SEQ ID NO: 183–185), og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 16, SEQ ID NO: 179–182). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 16, SEQ ID NO: 183–185), og CH1- og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 186 og/eller 187). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 16, SEQ ID NO: 183–185), og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 16, SEQ ID NO: 179–182). 179–182), og CH1 og/eller Fc (figur 16, SEQ ID NO: 186 og/eller 187).

Beskrevet heri er et antistoff omfattende en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 175–177). I en utførelsesform omfatter det variable domenet FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 171–174). I en utførelsesform omfatter antistoffet CL1-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 178). I en utførelsesform omfatter antistoffet en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 175–177), og FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-

35

- LC-sekvensen (SEQ ID NO: 171–174) angitt på figur 16. I en utførelsesform omfatter et antistoff en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 175–177) og CL1-sekvensen (SEQ ID NO: 178) angitt på figur 16. I en utførelsesform omfatter et
- 5 antistoff en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 175–177), og FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 171–174) angitt på figur 16, og CL1-sekvensen angitt på figur 16 (SEQ ID NO: 178).
- 10 I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 202–204). I en utførelsesform omfatter det variable domenet FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 198–201). I en utførelsesform omfatter antistoffet CH1-
- 15 og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 205 og/eller 206). I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 17, SEQ ID NO: 202–204) og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 17, SEQ ID NO: 198–201). I en utførelsesform omfatter et
- 20 antistoff ifølge oppfinnelsen en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 17, SEQ ID NO: 202–204) og CH1- og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 205 og/eller 206). I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen
- 25 (figur 17, SEQ ID NO: 202–204) og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 17, SEQ ID NO: 198–201). 198–201) og CH1 og/eller Fc (figur 17, SEQ ID NO: 205 og/eller 206).
- I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff omfattende en lett kjedes
- 30 variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 194–196). I en utførelsesform omfatter det variable domenet FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 190–193). I en utførelsesform omfatter antistoffet CL1-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 197). I en utførelsesform omfatter
- 35 antistoffet ifølge oppfinnelsen en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 194–196), og FR1-LC-,

FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 190–193) angitt på figur 17. I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 194–196) og CL1-sekvensen (SEQ ID NO: 197) angitt på figur 17. I en utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 194–196) og FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 190–193) angitt på figur 17, og CL1-sekvensen angitt på figur 17 (SEQ ID NO: 197).

10

Beskrevet heri er et antistoff omfattende en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 221–223). I en utførelsesform omfatter det variable domenet FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 217–220). I en utførelsesform omfatter antistoffet CH1- og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 224 og/eller 225). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 18, SEQ ID NO: 221–223), og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 18, SEQ ID NO: 217–220). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 18, SEQ ID NO: 221–223) og CH1- og/eller Fc-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 224 og/eller 225). I en utførelsesform omfatter et antistoff en tung kjedes variable domene omfattende HVR1-HC-, HVR2-HC- og/eller HVR3-HC-sekvensen (figur 18, SEQ ID NO: 221–223) og FR1-HC-, FR2-HC-, FR3-HC- og/eller FR4-HC-sekvensen (figur 18, SEQ ID NO: 217–220) og CH1 og/eller Fc (figur 18, SEQ ID NO: 224 og/eller 225).

Beskrevet heri er et antistoff omfattende en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 213–215). I en utførelsesform omfatter det variable domenet FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 209–212). I en utførelsesform omfatter antistoffet CL1-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 216). I en utførelsesform omfatter antistoffet en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 213–215) og FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-

35

- LC-sekvensen (SEQ ID NO: 209–212) angitt på figur 18. I en utførelsesform omfatter et antistoff en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 213–215) og CL1-sekvensen (SEQ ID NO: 216) angitt på figur 18. I en utførelsesform omfatter et
- 5 antistoff en lett kjedes variable domene omfattende HVR1-LC-, HVR2-LC- og/eller HVR3-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 213–215) og FR1-LC-, FR2-LC-, FR3-LC- og/eller FR4-LC-sekvensen (SEQ ID NO: 209–212) angitt på figur 18 og CL1-sekvensen angitt på figur 18 (SEQ ID NO: 216).
- 10 Også beskrevet er cysteinkonstruerte antistoffer hvor én eller flere aminosyrer av et morantistoff er utbyttet med en fri cysteinamino-syre som beskrevet i WO2006/034488; US 2007/0092940 (hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri). Enhver form for anti-CD79b-antistoff kan være slik konstruert, dvs. mutert. Et Fab-morantistofffragment kan for eksempel være konstruert for å
- 15 danne en cysteinkonstruert Fab, heri betegnet "tioFab". Et monoklonalt morantistoff kan likeledes være konstruert for å danne en "tioMab". Det bør anføres at mutasjon på et enkelt sted gir en enkelt konstruert cysteinenhet i en tioFab, mens mutasjon på et enkelt sted gir to konstruerte cysteinenheter i en tioMab, på grunn av den dimeriske karakteren til IgG-antistoffet. De
- 20 cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffene omfatter monoklonale antistoffer, humaniserte eller kimære monoklonale antistoffer, og antigenbindingsfragmenter av antistoffer, fusjonspolypeptider og analoger som fortrinnsvis binder celleassosierte CD79b-polypeptider. Et cysteinkonstruert antistoff kan eventuelt omfatte et antistoff omfattende et cystein ved en posisjon beskrevet heri i
- 25 antistoffet eller Fab, hvilket skyldes sekvenskonstruksjonen og/eller seleksjonen av antistoffet, uten nødvendigvis å endre et morantistoff, slik som ved fagvisningsantistoffkonstruksjon og -seleksjon eller gjennom de novo-konstruksjon av en lett kjedes og/eller tung kjedes rammeverksekvenser og konstante regioner. Et cysteinkonstruert antistoff omfatter én eller flere frie
- 30 cysteinamino-syrer med en tiolreaktivitetsverdi i områdene fra 0,6 til 1,0, 0,7 til 1,0 eller 0,8 til 1,0. En fri cysteinamino-syre er en cysteinenhet som er konstruert til morantistoffet og er ikke del av en disulfidbro. Cysteinkonstruerte antistoffer er nyttige for binding av cytotoksiske og/eller bildediagnostiserende forbindelser på stedet for det konstruerte cysteinet gjennom for eksempel et maleimid eller
- 35 haloacetyl. Den nukleofile reaktiviteten til en Cys-enhets tiolfunksjonalitet overfor en maleimidgruppe er ca. 1000 ganger høyere enn enhver annen

aminosyrefunksjonalitet i et protein, slik som aminogruppen av lysinenheter eller den N-terminale aminogruppen. Tiolspesifikk funksjonalitet i jodacetyl- og maleimidreagenser kan reagere med aminogrupeer, men høyere pH ($> 9,0$) og lengre reaksjonstider kreves (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A
 5 Practical Approach, Academic Press, London).

I et aspekt omfatter et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff et konstruert cystein i en hvilken som helst av følgende posisjoner, hvor posisjonen er nummerert ifølge Kabat et al. i den lette kjeden (se Kabat et al (1991)
 10 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes av Health, Bethesda, MD) og ifølge EU-nummerering i den tunge kjeden (omfattende Fc-regionen) (se Kabat et al. (1991) ovenfor), hvor den lette kjedens konstante region beskrevet ved understreking på figur 24A, 25A, 26A, 27A, 28, 48A og 49A begynner ved posisjon 109 (Kabat-
 15 nummerering) og den tunge kjedens konstante region beskrevet ved understreking på figur 24B, 25B, 26B, 27B, 28B, 48B og 49B begynner ved posisjon 118 (EU-nummerering). Posisjonen kan også være betegnet ved dens posisjon i sekvensnummerering av aminosyrene i den lette kjede eller tunge kjeden av full lengde angitt på figur 24–28, 48 og 49. Ifølge en utførelsesform
 20 for oppfinnelsen omfatter et anti-CD79b-antistoff et konstruert cystein i LC-V205C (Kabat-nummer: Val 205; sekvensnummer 209 på figur 27A og 49A konstruert til å være Cys ved denne posisjonen). Det konstruerte cysteinet i den lette kjeden er angitt med fet, dobbelt understreket tekst på figur 27A og 49A. Ifølge en utførelsesform omfatter et anti-CD79b-antistoff et konstruert cystein i
 25 HC-A118C (EU-nummer: Ala 118; Kabat-nummer 114; sekvensnummer 118 på figur 24B, 25B, 26B, 28B eller 48B konstruert til å være Cys ved denne posisjonen). Det konstruerte cysteinet i den tunge kjeden er angitt med fet, dobbelt understreket tekst på figur 24B, 25B, 26B, 28B eller 48B. Ifølge en utførelsesform omfatter et anti-CD79b-antistoff et konstruert cystein i Fc-S400C
 30 (EU-nummer: Ser 400; Kabat-nummer 396; sekvensnummer 400 på figur 24B, 25B, 26B, 28B eller 48B konstruert til å være Cys ved denne posisjonen). I andre utførelsesformer er det konstruerte cysteinet i den tunge kjeden (omfattende Fc-regionen) ved hvilken som helst av følgende posisjoner (ifølge Kabat-nummerering med EU-nummerering i parentes): 5, 23, 84, 112, 114 (118
 35 EU-nummerering), 116 (120 EU-nummerering), 278 (282 EU-nummerering), 371 (375 EU-nummerering) eller 396 (400 EU-nummerering). Endringer i

aminosyren i disse posisjonene for et humanisert anti-CD79b-morantistoff er således: V5C, A23C, A84C, S112C, A114C (A118C EU-nummerering), T116C (T120C EU-nummerering), V278C (V282C EU-nummerering), S371C (S375C EU-nummerering) eller S396C (S400C EU-nummerering). Endringer i aminosyren

5 ved disse posisjonene for et kimært anti-CD79b-morantistoff er således: Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (A118C EU-nummerering), T116C (T120C EU-nummerering), V278C (V282C EU-nummerering), S371C (S375C EU-nummerering) eller S396C (S400C EU-nummerering). Endringer i aminosyren ved disse posisjonene for et anti-cynoCD79b-morantistoff er således: Q5C,

10 T23C, S84C, S112C, A114C (A118C EU-nummerering), T116C (T120C EU-nummerering), V278C (V282C EU-nummerering), S371C (S375C EU-nummerering) eller S396C (S400C EU-nummerering). I andre utførelsesformer er det konstruerte cysteinet i den lette kjeden ved en hvilken som helst av følgende posisjoner (ifølge Kabat-nummerering): 15, 110, 114, 121, 127, 168,

15 205. Endringer i aminosyren ved disse posisjonene for et humanisert anti-CD79b-morantistoff er således: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C eller V205C. Endringer i aminosyren ved disse posisjonene for et kimært anti-CD79b-morantistoff er således: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C eller V205C. Endringer i aminosyren ved disse posisjonene for et anti-

20 cynoCD79b-morantistoff er således: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C eller V205C.

I et aspekt omfatter det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet én eller flere frie cysteinaminosyrer hvor det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoff binder til

25 et CD79b-polypeptid og fremstilles ved en fremgangsmåte omfattende utbytting av én eller flere aminosyreenheter fra et anti-CD79b-morantistoff med cystein hvor morantistoffet omfatter minst én HVR-sekvens valgt fra:

- a) HVR-L1 omfattende sekvens A1–A15, hvor A1–A15 er KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) eller KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID
- 30 NO: 137),
- b) HVR-L2 omfattende sekvens B1–B7, hvor B1–B7 er AASNLES (SEQ ID NO: 132)
- c) HVR-L3 omfattende sekvens C1–C9, hvor C1–C9 er QQSNEPLT (SEQ ID NO: 133)

d) HVR-H1 omfattende sekvens D1–D10, hvor D1–D10 er GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

e) HVR-H2 omfattende sekvens E1–E18, hvor E1–E18 er GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) og

5 f) HVR-H3 omfattende sekvens F1–F10, hvor F1–F10 er TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136) eller TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

Beskrevet heri er et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff, omfattende en aminosyresekvens med minst ca. 80 % aminosyresekvensidentitet, eventuelt
10 minst ca. 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % eller 100 % aminosyresekvensidentitet, til et cysteinkonstruert antistoff med en aminosyresekvens av full lengde som beskrevet heri, eller et cysteinkonstruert antistoffs aminosyresekvens uten signalpeptidet som beskrevet heri,

15 et isolert cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff omfattende en aminosyresekvens som er kodet av en nukleotidsekvens som hybridiseres til komplementet av et DNA-molekyl som koder for a) et cysteinkonstruert antistoff med en aminosyresekvens av full lengde som beskrevet heri, b) et
20 cysteinkonstruert antistoffs aminosyresekvens uten signalpeptidet som beskrevet heri, c) et ekstracellulært domene av et transmembrant cysteinkonstruert antistoffprotein, med eller uten signalpeptidet, som beskrevet heri, d) en aminosyresekvens kodet av en hvilken som helst av nukleinsyresekvensene beskrevet heri eller e) et hvilket som helst annet
25 spesifikt definert fragment av et cysteinkonstruert antistoffs aminosyresekvens av full lengde som beskrevet heri,

et isolert cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff uten den N-terminale signalsekvensen og/eller uten det initierende metioninet og er kodet av en
30 nukleotidsekvens som koder for en slik aminosyresekvens som beskrevet i. Fremgangsmåter for produksjon av det samme er også beskrevet heri, hvor disse fremgangsmåtene omfatter dyrking av en vertscelle omfattende en vektor som omfatter det egnede kodende nukleinsyremolekylet under betingelser som

egner seg til ekspresjon av det cysteinkonstruerte antistoffet og utvinning av det cysteinkonstruerte antistoffet fra cellekulturen,

5 et isolert cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff, som enten er transmembrant domeneslettet eller transmembrant domeneinaktivert. Fremgangsmåter for produksjon av det samme er også heri beskrevet, hvor disse fremgangsmåtene omfatter dyrking av en vertscelle omfattende en vektor som omfatter det egnede kodende nukleinsyremolekylet under betingelser som egner seg til ekspresjon av det cysteinkonstruerte antistoffet og utvinning av det
10 cysteinkonstruerte antistoffet fra cellekulturen,

isolerte kimære cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer omfattende et hvilket som helst av de heri beskrevne cysteinkonstruerte antistoffene fusjonert til et heterologt (ikke-CD79b) polypeptid. Eksempler på slike kimære molekyler
15 omfatter et hvilket som helst av de heri beskrevne cysteinkonstruerte antistoffene fusjonert til et heterologt polypeptid slik som for eksempel en epitopmarkørsekvens eller en Fc-region av et immunglobulin;

Det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet kan være et monoklonalt antistoff,
20 et antistoffragment, et kimært antistoff, et humanisert antistoff, et enkjedet antistoff eller et antistoff som kompetitivt inhiberer binding av et anti-CD79b-polypeptidantistoff til dets respektive antigene epitop. Antistoffene kan eventuelt være konjugert til et vekstinhiberende stoff eller cytotoxisk stoff slik som et toksin, herunder for eksempel et auristatin, et maytansinoid, et dolostatinderivat
25 eller et caliceamicin, et antibiotikum, en radioaktiv isotop, et nukleolytisk enzym eller lignende. Antistoffene kan eventuelt være fremstilt i CHO-celler eller bakterieceller og fortrinnsvis inhibere vekst eller proliferasjon av eller indusere døden for en celle hvortil de binder. Antistoffene kan i sammenheng med diagnostisering være påvisbart merket, bundet til en fast fase eller lignende.

30 Også beskrevet heri er vektorer omfattende DNA som koder for et hvilket som helst av de heri beskrevne anti-CD79b-antistoffene og cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffene. Vertsceller omfattende enhver slik vektor stilles også til rådighet. Som eksempel kan vertscellene være CHO-celler, E. coli-celler eller
35 gjærceller. En fremgangsmåte for produksjon av et hvilket som helst av de heri beskrevne polypeptidene stilles videre til rådighet og omfatter dyrking av

vertsceller under betingelser som egner seg til ekspresjon av det ønskede polypeptidet og utvinning av det ønskede polypeptidet fra cellekulturen.

Cysteinkonstruerte antistoffer kan være nyttige for behandling av kreft og
 5 omfatter antistoffer som er spesifikke for celleoverflate- og transmembranreseptorer, og tumorassosierte antigener (TAA). Slike antistoffer kan anvendes som nakne antistoffer (ukonjugert til et legemiddel eller markørenhet) eller som antistofflegemiddelkonjugater (ADC). Cysteinkonstruerte antistoffer kan være stedsspesifikt og virkningsfullt koblet med et tiolreaktivt
 10 reagens. Det tiolreaktive reagenset kan være et multifunksjonelt linkerreagens, et inngangsmarkørreagens, et fluorforreagens, eller et legemiddellinkermellomprodukt. Det cysteinkonstruerte antistoffet kan være merket med en påvisbar markør, immobilisert i en fast fase og/eller konjugert med en legemiddelenhet. Tiolreaktivitet kan være generalisert til ethvert
 15 antistoff hvor substitusjon av aminosyrer med reaktive cysteinamiosyrer kan skje innenfor områdene i den lette kjeden valgt fra aminosyreområde: L10–L20, L105–L115, L109–L119, L116–L126, L122–L132, L163–L173, L200–L210, og innenfor områdene i den tunge kjeden valgt fra aminosyreområde: H1–H10, H18–H28, H79–H89, H107–H117, H109–H119, H111–H121, og i Fc-regionen
 20 innenfor områdene valgt fra H270–H280, H366–H376, H391–401, hvor nummereringen av aminosyreposisjoner begynner ved posisjon 1 i Kabats nummereringssystem (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) og deretter fortsetter sekvensielt som beskrevet i
 25 WO2006034488; US 2007/0092940. Tiolreaktivitet kan også være generalisert til visse domener i et antistoff, slik som den lette kjedens konstante domene (CL) og den tunge kjedens konstante domener, CH1, CH2 og CH3. Cysteinutbyttinger som resulterer i tiolreaktivitetsverdier på 0,6 og høyere, kan være foretatt i den tunge kjedens konstante domener α , δ , ϵ , γ og μ av intakte
 30 antistoffer: henholdsvis IgA, IgD, IgE IgG, og IgM, herunder IgG-underklassene: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA og IgA2. Slike antistoffer og deres anvendelser er beskrevet i WO2006/034488; US 2007/0092940.

Cysteinkonstruerte antistoffer beholder fortrinnsvis antigenbindingsevnen til
 35 deres villtype-morantistoff-motstykker. Cysteinkonstruerte antistoffer kan således binde, fortrinnsvis spesifikt, til antigener. Slike antigener omfatter for

eksempel tumorassosierte antigener (TAA), celleoverflatereseptorproteiner og andre celleoverflatemolekyler, transmembrane proteiner, signalproteiner, regulerende faktorer for celleoverlevelse, regulerende faktorer for celleproliferasjon, molekyler assosiert med (f.eks. kjent for eller antatt å bidra funksjonelt til) vevsutvikling eller -differensiering, lymfokiner, cytokiner, molekyler involvert i cellyklusregulering, molekyler involvert i vaskulogenese og molekyler assosiert med (f.eks. kjent for eller antatt å bidra funksjonelt til) angiogenese. Det tumorassosierte antigenet kan være en gruppedifferensieringsfaktor (dvs. et CD-protein, herunder blant annet CD79b). Cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer beholder antigenbindingsevnen til deres anti-CD79b-morantistoff-motstykker. Cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer kan således binde, fortrinnsvis spesifikt, til CD79b-antigener omfattende humant anti-CD79b-isoformer beta og/eller alfa, herunder når slike antigener er uttrykt på overflaten av celler, herunder blant annet B-celler.

15

I et aspekt kan antistoffer ifølge oppfinnelsen være konjugert med en hvilken som helst markørenhet som kan være kovalent bundet til antistoffet gjennom en reaktiv enhet, en aktivert enhet eller en reaktiv cysteintiolgruppe (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). Den bundne markøren kan fungere for å: i) stille til rådighet et påvisbart signal, ii) vekselvirke med en andre markør for å modifisere det påvisbare signalet stilt til rådighet av den første eller andre markøren, f.eks. for å gi FRET (fluorescensresonansenergioverføring), iii) stabilisere vekselvirkninger eller øke affinitet for binding, med antigen eller ligand, iv) påvirke mobilitet, f.eks. elektroforetisk mobilitet eller cellepermeabilitet, ved lading, hydrofobisitet, form eller andre fysiske parametere, eller v) stille til rådighet en oppfangingsenhet for å modulere ligandaffinitet, antistoff-/antigenbinding eller ionisk kompleksing.

30

Merkede cysteinkonstruerte antistoffer kan være nyttige i diagnostiske assayer, f.eks. for påvisning av ekspresjon av et antigen av interesse i spesifikke celler, vev eller serum. I sammenheng med diagnostisering vil antistoffet typisk merkes med en påvisbar enhet. En rekke markører er tilgjengelige, hvilke alminneligvis kan grupperes i følgende kategorier:

35

- Radioisotoper (radionuklider), slik som ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At eller ^{213}Bi . Radioisotopmerkede antistoffer er nyttige i reseptorutpekte bildediagnostiske forsøk. Antistoffet kan
- 5 merkes med ligandreagenser som binder, chelaterer eller på annen måte kompleksere et radioisotopmetall hvor reagenset er reaktivt med antistoffets konstruerte cysteintiol ved hjelp av teknikkene beskrevet i Current Protocols in Immunology, Volumes 1 og 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Chelaterende ligander som kan kompleksere et metallion,
- 10 omfatter DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA og TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Radionuklider kan utpekes via kompleksing med antistoffetlegemiddelkonjugatene ifølge oppfinnelsen (Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137–1146).
- 15 Linkerreagenser slik som DOTA-maleimid (4-maleimidobutyramidobenzyl-DOTA) kan fremstilles ved omsetning av aminobenzyl-DOTA med 4-maleimidobutansyre (Fluka) aktivert med isopropylklorformat (Aldrich) etter prosedyren til Axworthy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802–1807). DOTA-maleimidreagenser reagerer med de frie cysteinaminsyrene i de
- 20 cysteinkonstruerte antistoffene og stiller til rådighet et metall som kompleksere ligand på antistoffet (Lewis et al (1998) Bioconj. Chem. 9:72–86). Chelaterende linkermerkende reagenser slik som DOTA-NHS (1,4,7,10-tetraazasyklododekan-1,4,7,10-tetraeddiksyremono(N-hydroksysukkinimidester) er kommersielt tilgjengelige (Macrocyclics, Dallas, TX). Reseptormålbildediagnostikk med
- 25 radionuklidmerkede antistoffer kan stille til rådighet en markør for ledningsveiaktivering ved påvisning og kvantitering av progressiv akkumulasjon av antistoffer i tumorvev (Albert et al (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207–1210). De konjugerte radiometallene kan forbli intracellulære etter lysosomal nedbryting.
- 30 Metallchelatkompleser som egner seg som antistoffmarkører for bildediagnostiske forsøk, er beskrevet i: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al (1983) J. Immunol. Methods
- 35 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. Cancer1990, Suppl.

- 10:21–26; Izard et al (1992) Bioconjugate Chem. 3:346–350; Nikula et al (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387–90; Camera et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955–62; Kukis et al (1998) J. Nucl. Med. 39:2105–2110; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663–1670; Camera et al (1994) J. Nucl. Med. 21:640–646;
- 5 Ruegg et al (1990) Kreft 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) Kreft Biotherapy
- 10 & 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.
- 15 Fluorescerende markører slik som sjeldne jordchelater (europiumchelater), fluoresceintyper omfattende FITC, 5-karboksyfluorescein, 6-karboksyfluorescein, rhodamintyper omfattende TAMRA, dansyl, Lissamine, cyaniner, fykoerytriner, texasrød og analoger derav. De fluorescerende markørene kan konjugeres til antistoffer ved hjelp av teknikkene beskrevet i for eksempel Current Protocols in
- 20 Immunology ovenfor. Fluorescerende fargestoffer og fluorescerende markørreagenser omfatter dem som er kommersielt tilgjengelige fra Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) og Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).
- 25 En rekke enzymsubstratmarkører er tilgjengelige eller beskrevet (US 4275149). Enzymet katalyserer alminneligvis en kjemisk endring av et kromogent substrat som kan måles ved hjelp av forskjellige teknikker. Enzymene kan for eksempel katalysere en fargeendring i et substrat, som kan måles spektrofotometrisk. Enzymet kan eventuelt eller i tillegg endre substratets fluorescens eller
- 30 kjemiluminescens. Teknikker for kvantifisering av en endring i fluorescens er beskrevet ovenfor. Det kjemiluminescerende substratet blir elektronisk magnetisert av en kjemisk reaksjon og kan deretter utsende lys som kan måles (ved hjelp av f.eks. et kjemiluminometer), eller som gir energi til en fluorescerende akseptor. Eksempler på enzymatiske markører omfatter
- 35 luciferaser (f.eks. luciferase fra ildflue og bakterieluciferase, US 4737456), luciferin, 2,3-dihydroftalazindioner, malatdehydrogenase, urease, peroksidase

- slik som pepperrotperoksidase (HRP), alkalisk fosfatase (AP), β -galaktosidase, glukoamylase, lysozyme, sakkaridoksidaser (f.eks. glukoseoksidase, galaktoseoksidase og glukose-6-fosfatdehydrogenase), heterosykliske oksidaser (slik som urikase og xantinoksidase), laktoperoksidase, mikroperoksidase og
- 5 lignende. Teknikker for konjugering av enzymer til antistoffer er beskrevet i O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", i Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147–166.
- 10 Eksempler på enzymsubstratkombinasjoner omfatter for eksempel:
- i) pepperrotperoksidase (HRP) med hydrogenperoksidase som et substrat, hvor hydrogenperoksidasen oksiderer en fargestofformarkør (f.eks. ortofenylendiamin (OPD) eller 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinhydroklorid (TMB)),
 - 15 ii) alkalinfosfatase (AP) med paranitrofenylfosfat som kromogent substrat og
 - iii) β -D-galaktosidase (β -D-Gal) med et kromogent substrat (f.eks. p-nitrofenyl- β -D-galaktosidase) eller fluorgent substrat 4-metyllumbelliferyl- β -D-galaktosidase.
- 20 En rekke andre enzymsubstratkombinasjoner er tilgjengelige for fagpersoner. En generell oversikt finnes i US 4275149 og US 4318980.
- En markør kan indirekte konjugeres med en aminosyresidekjede, en aktivert aminosyresidekjede, et cysteinkonstruert antistoff og lignende. Antistoffet kan
- 25 for eksempel konjugeres med biotin, og enhver av de tre brede kategoriene av markører nevnt ovenfor kan konjugeres med avidin eller streptavidin, eller omvendt. Biotin binder selektivt til streptavidin, og markøren kan således konjugeres med antistoffet på denne indirekte måten. For å oppnå indirekte konjugering av markøren med polypeptidvarianten konjugeres
- 30 polypeptidvarianten eventuelt med et lite haptent (f.eks. digoksin) og en av de forskjellige markørtypene nevnt ovenfor konjugeres med en anti-haptentpolypeptidvariant (f.eks. anti-digoksinantistoff). Indirekte konjugering av

markøren med polypeptidvarianten kan således oppnås (Hermanson, G. (1996) i Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego).

5 Antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan anvendes i alle kjente assaymetoder, slik som ELISA, kompetitive bindingsassayer, direkte og indirekte sandwichassayer og immunutfellingsassayer (Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, s.147–158, CRC Press, Inc.).

10 En påvisningsmarkør kan være nyttig for lokalisering, visualisering og kvantitering av en binding eller gjenkjenningshendelse. De merkede antistoffene ifølge oppfinnelsen kan påvise celleoverflatereseptorer. En annen anvendelse for påvisbart merkede antistoffer er en fremgangsmåte for kulebasert immuninnfanging omfattende konjugering av en kule med et fluorescerende merket antistoff og påvisning av et fluorescenssignal ved binding av et ligand.

15 Lignende bindingspåvisningsmetoder anvender overflateplasmonresonansvirkningen (SPR) til å måle og påvise antistoffantigenvekselvirkninger.

20 Påvisningsmarkører slik som fluorescerende fargestoffer og kjemiluminescerende fargestoffer (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) stiller til rådighet et påvisbart signal og er alminneligvis anvendelige for merking av antistoffer, fortrinnsvis med følgende egenskaper: i) det merkede antistoffet bør produsere et svært høyt signal med lav bakgrunn

25 slik at små mengder av antistoffer kan påvises sensitivt i både cellefrie og cellebaserte assayer, og ii) det merkede antistoffet bør være fotostabilt slik at det fluorescerende signalet kan observeres, overvåkes og registreres uten vesentlig fotobleking. For anvendelser som involverer celleoverflatebinding av merket antistoff til membraner eller celleoverflater, spesielt levende celler, har

30 markørene fortrinnsvis iii) god vannløselighet for å oppnå virkningsfull konjugatkonsentrasjon og påvisningssensitivitet og iv) er ikke-toksiske overfor levende celler for ikke å forstyrre cellenes normale metabolske prosessene eller forårsake prematur celledød.

35 Direkte kvantifisering av cellulær fluorescensintensitet og oppregning av fluorescerende merkede hendelser, f.eks. celleoverflatebinding av

- peptidfargestoffkonjugater, kan konjugeres på et system (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) som automatiserer blanding og lesning, ikke-radioaktive assayer med levende celler eller kuler (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193–204). Anvendelser av merkede antistoffer omfatter også celleoverflatereseptorbindingsassayer, immuninnfangingsassayer, fluorescensbundne immunsorbentassayer (FLISA), kaspasespalting (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), apoptose (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39–51) og cytotoxitsassayer. Fluorimetriske mikrovolumassayteknologi kan anvendes til å identifisere et molekyls opp- eller nedregulering som er utpekt til celleoverflaten (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143–51).
- 20 Merkede antistoffer ifølge oppfinnelsen er nyttige som visningsbiomarkører og sonder i de forskjellige fremgangsmåtene og teknikkene for biomedisinsk og molekylær bildediagnostikk slik som: i) MR (magnetisk resonanstomografi), ii) MicroCT (computertomografi), iii) SPECT (enfotonstomografi), iv) PET (positronemisjonstomografi) Chen et al (2004) Bioconjugate Chem. 15:41–49, v) bioluminescens, vi) fluorescens og vii) ultralyd. Immunsintigrafi er en bildediagnostisk prosedyre hvor antistoffer merket med radioaktive stoffer tilføres til et dyr eller en human pasient og et bilde tas av steder i kroppen hvor antistoffet lokaliseres (US 6528624). Bildediagnostiske biomarkører kan objektivt måles og vurderes som en indikator for normale biologiske prosesser, patogene prosesser eller farmakologiske responser på en terapeutisk intervensjon. Biomarkører kan være av forskjellige typer: Type 0 er naturlige historiemarkører for en sykdom og korrelerer longitudinelt med kjente kliniske indekser, f.eks. MR-vurdering av synovial inflammasjon i revmatoid artritt; type I-markører innfanger virkningen av en intervensjon i samsvar med en virkemekanisme, selv om mekanismen ikke nødvendigvis er assosiert med klinisk resultat; type II-markører fungerer som surrogatendepunkter hvor endringen i, eller signalet fra,

biomarkøren predikerer en klinisk fordel for å "validere" den utpekte responsen, slik som målt benerosjon i revmatoid artritt ved CT. Bildediagnostiske biomarkører kan således stille til rådighet farmakodynamisk (PD) terapeutisk informasjon om: i) ekspresjon av et målprotein, ii) binding av en terapeutikk til
 5 målproteinet, dvs. selektivitet og iii) farmakokinetiske data om clearance og halveringstid. Fordeler ved bildediagnostiske biomarkører in vivo i forhold til labbaserte biomarkører omfatter: ikke-invasiv behandling, kvantifiserbar helkroppsvurdering, repetitiv dosering og vurdering, dvs. flere tidspunkter og potensielt overførbare virkninger fra prekliniske (små dyr) til kliniske (humane)
 10 resultater. For noen anvendelser erstatter eller begrenser biobildediagnostikk antallet dyreforsøk i prekliniske studier.

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

Peptider og proteiner merket med to enheter og en fluorescerende reporter samt
 30 bråkjølt i tilstrekkelig nærhet gjennomgår fluorescensresonansenergioverføring (FRET). Reportergrupper er vanligvis fluorescerende fargestoffer som magnetiseres av lys ved en bestemt bølgelengde og overfører energi til en akseptorgruppe, eller quenchergruppe, med den riktige Stokes-forskyvningen for stråling ved største lysstyrke. Fluorescerende fargestoffer omfatter molekyler
 35 med utvidet aromatisitet, slik som fluorescein og rhodamin, og deres derivater. Den fluorescerende reporteren kan delvis eller vesentlig bråkjøles av

quencherenheten i et intakt peptid. Ved spalting av peptidet ved en peptidase eller protease kan en påvisbar økning i fluorescens måles (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18–34).

5

De merkede antistoffene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes som et affinitetsrenningsstoff. I denne fremgangsmåten immobiliseres det merkede antistoffet på en fast fase slik som et Sephadex-harpiks eller filterpapir ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjent i teknikken. Det immobiliserte antistoffet settes i kontakt med en prøve inneholdende antigenet som skal renses, og deretter skylles fasen med et egnet løsemiddel som fjerner i det vesentlige alt materialet i prøven unntatt antigenet som skal renses, hvilket er bundet til den immobiliserte polypeptidvarianten. Til slutt skylles fasen med et annet egnet løsemiddel, slik som glycinbuffer, pH 5,0, som frisetter antigenet fra polypeptidvarianten.

15

Merkende reagenser bærer vanligvis reaktiv funksjonalitet som kan reagere i) direkte med et cysteintiol fra et cysteinkonstruert antistoff for å danne det merkede antistoffet, ii) med en linkerreagens for å danne et linkermerket mellomprodukt, eller iii) med et linkerantistoff for å danne det merkede antistoffet. Reaktiv funksjonalitet for merkende reagenser omfatter: maleimid, haloacetyl, jodacetamidsukkinimidylester (f.eks. NHS, N-hydroksysukkinimid), isotiocyanat, sulfonylklorid, 2,6-diklortriazinyl, pentafluorfenylester og fosforamidit, selv om andre funksjonelle grupper kan anvendes.

25

Et eksempel på en reaktiv funksjonell gruppe er N-hydroksysukkinimidylester (NHS) fra en karboksylgruppesubstituent av en påvisbar markør, f.eks. biotin eller et fluorescerende fargestoff. Markørens NHS-ester kan preformes, isoleres, renses og/eller karakteriseres, eller den kan dannes in situ og reageres med en nukleofil gruppe av et antistoff. Markørens karboksylform aktiveres typisk ved reaksjon med en kombinasjon av et karbodiimidreagens, f.eks. disykloheksylkarbodiimid, diisopropylkarbodiimid eller et uroniumreagens, f.eks. TSTU-(O-(N-sukkinimidyl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumtetrafluorborat, HBTU-(O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorfosfat) eller HATU-(O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorfosfat), en aktivator, slik som 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) og N-hydroksysukkinimid for å

35

gi markørens NHS-ester. I noen tilfeller kan markøren og antistoffet kobles ved aktivering av markøren in situ og reaksjon med antistoffet for å danne markørantistoffkonjugatet i ett trinn. Andre aktiverings- og koblingsreagenser omfatter

5 TBTU-(2-(1H-benzotriazo-1-yl)-1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorofosfat), TFFH-(N,N',N'',N'''-tetrametyluronium-2-fluor-heksafluorofosfat), PyBOP-(benzotriazol-1-yl-oksy-tris-pyrrolidino-fosfoniumheksafluorofosfat), EEDQ-(2-etoksy-1-etoksykarbonyl-1,2-dihydro-quinolin), DCC-(disykloheksylkarbodiimid), DIPCDI-(diisopropylkarbodiimid), MSNT-(1-(mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol og arylsulfonylhalider,

10 f.eks. triisopropylbenzensulfonylklorid.

Albuminbindingspeptid-Fab-forbindelser ifølge oppfinnelsen:

I et aspekt er antistoffet ifølge oppfinnelsen fusjonert til et albuminbindingsprotein. Plasmaproteinbinding kan være et effektivt middel for

15 forbedring av de farmakokinetiske egenskapene til molekyler med kort levetid. Albumin er det proteinet som det finnes mest av i plasma. Serumalbuminbindingspeptider (ABP) kan endre farmakodynamikken til fusjonerte proteiner med aktivt domene, herunder endring av vevsopptak, penetrering og diffusjon. Disse farmakodynamiske parameterne kan moduleres

20 ved spesifikk seleksjon av den relevante serumalbuminbindingspeptidsekvensen (US 20040001827). En serie av albuminbindingspeptider ble identifisert ved fagvisningsscreening (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). Forbindelser ifølge oppfinnelsen omfatter

25 ABP-sekvenser beskrevet av: i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 i tabell III og IV, s. 35038; ii) US 20040001827 ved SEQ ID NO: 9-22, og iii) WO 01/45746 s. 12-13, hvortil det er henvist, og som i sin helhet er opptatt heri. Albuminbindings-(ABP)-Fab-er er konstruert ved fusjon av et albuminbindingspeptid til C-terminalen i den tunge kjede med Fab i et

30 støkiometrisk forhold på 1 : 1 (1 ABP / 1 Fab). Det ble påvist at assosiasjon av disse ABP-Fab-ene med albumin økte antistoffets halveringstid med mer enn 25 ganger hos kaniner og mus. De ovennevnte reaktive Cys-enhetene kan derfor tilføres til disse ABP-Fab-ene og anvendes til stedsspesifikk konjugering med cytotoksiske legemidler etterfulgt av dyrestudier in vivo.

Eksempler på albuminbindingspeptidsekvenser omfatter blant annet aminosyresekvensene angitt i SEQ ID NO: 246–250:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 246
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 247
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 248
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO: 249
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO: 250

5 **Antistofflegemiddelkonjugater**

I et annet aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet immunkonjugater, eller antistofflegemiddelkonjugater (ADC), omfattende et antistoff konjugert til et cytotoxisk stoff slik som et kjemoterapeutisk stoff, et legemiddel, et vekstinhiberende middel, et toksin (f.eks. et enzymatisk aktivt toksin av bakterie-, sopp-, plante- eller dyreopprinnelse eller fragmenter derav), eller en radioaktiv isotop (dvs. et radiokonjugat). I et annet aspekt stiller oppfinnelsen videre til rådighet fremgangsmåter for anvendelse av immunkonjugatene. I et aspekt omfatter et immunkonjugat ethvert av de ovennevnte anti-CD79b-antistoffene kovalent bundet til et cytotoxisk stoff eller et påvisbart stoff.

I et aspekt binder et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til den samme epitopen på CD79b bundet av et annet CD79b-antistoff. I en annen utførelsesform binder et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til den samme epitopen på CD79b bundet av Fab-fragmentet av et monoklonalt antistoff dannet av hybridomer deponert hos ATCC som HB11413 20. juli 1993, et monoklonalt antistoff omfattende de variable domenene med SEQ ID NO: 10 (figur 7A–B) og SEQ ID NO: 14 (figur 8A–B) eller et kimært antistoff omfattende det variable domenet i enten antistoff dannet av HB11413-hybridomer deponert hos ATCC 20.juli 1993 og konstante domener fra IgG1, eller de variable domenene i monoklonalt antistoff omfattende sekvensene av SEQ ID NO: 10 (figur 7A–B) og SEQ ID NO: 14 (figur 8A–B). I en annen utførelsesform binder et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til den samme epitopen på CD79b bundet av et annet CD79b-

antistoff (dvs. CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), anti-humant CD79b-antistoff (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

5

I et annet aspekt binder et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til en epitop på CD79b forskjellig fra en epitop bundet av et annet CD79b-antistoff. I en annen utførelsesform binder et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til en epitop på CD79b forskjellig fra en epitop bundet av Fab-fragmentet av monoklonalt antistoff dannet av HB11413-hybridomer deponert hos ATCC 20. juli 1993, idet monoklonalt antistoff omfatter de variable domenene med SEQ ID NO: 10 (figur 7A-B) og SEQ ID NO: 14 (figur 8A-B), eller kimært antistoff omfattende det variable domenet i enten antistoffet dannet av HB11413-hybridomer deponert hos ATCC 20. juli 1993 og konstante domener fra IgG1, eller de variable domenene i monoklonalt antistoff omfattende sekvensene av SEQ ID NO: 10 (figur 7A-B) og SEQ ID NO: 14 (figur 8A-B). I en annen utførelsesform binder et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til en epitop på CD79b forskjellig fra en epitop på CD79b bundet av et annet CD79b-antistoff (dvs. CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), anti-humant CD79b-antistoff (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

I et aspekt er et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen forskjellig fra (dvs. det er ikke) et Fab-fragment av, det monoklonale antistoffet dannet av hybridomer deponert hos ATCC som HB11413 20. juli 1993, det monoklonale antistoffet omfattende de variable domenene med SEQ ID NO: 10 (figur 7A-B og SEQ ID NO: 14 (figur 8a-B), eller kimært antistoff omfattende det variable domenet i antistoff dannet av hybridomer deponert hos ATCC som HB11413 20.juli 1993 og konstante domener fra IgG1, eller de variable domenene i monoklonalt antistoff omfattende sekvensene av SEQ ID NO: 10 (figur 7A-B) og SEQ ID NO: 14 (figur 8A-B). I en annen utførelsesform er et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen forskjellig fra (dvs. det er ikke) et Fab-fragment av et annet CD79b-antistoff (dvs. CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), anti-humant CD79b-antistoff (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

I et aspekt binder et antistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til CD79b av en første dyreart og binder ikke spesifikt til CD79b av en andre dyreart. I en utførelsesform er den første dyrearten mennesker og/eller primater (f.eks. cynomolgus-ape), og den andre dyrearten er murin (f.eks. mus) og/eller hundebasert. I en utførelsesform er den første dyrearten mennesker. I en utførelsesform er den første dyrearten primater, f.eks. cynomolgus-ape. I en utførelsesform er den andre dyrearten murin, f.eks. mus. I en utførelsesform er den andre dyrearten hundebasert.

10

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet sammensetninger omfattende ett eller flere antistoffer ifølge oppfinnelsen og et bærestoff. I en utførelsesform er bærestoffet farmasøytisk akseptabelt.

15 Søknaden beskriver også nukleinsyrer som koder for et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen.

Søknaden beskriver også vektorer omfattende en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen.

20

Søknaden beskriver også vertsceller omfattende en nukleinsyre eller en vektor ifølge oppfinnelsen. En vektor kan være av alle typer, f.eks. en rekombinant vektor slik som en ekspresjonsvektor. En hvilken som helst av en rekke vertsceller kan anvendes. I en utførelsesform er en vertscelle en prokaryotisk celle, f.eks. *E.coli*. I en utførelsesform er en vertscelle en eukaryotisk celle, f.eks. en pattedyrscelle slik som CHO-celle (Chinese Hamster Ovary).

25

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet fremgangsmåter for fremstilling av et antistoff ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen stiller for eksempel til rådighet en fremgangsmåte for fremstilling av et CD79b-antistoff (som definert heri omfatter full lengde og fragmenter derav), idet nevnte fremgangsmåte omfatter ekspresjon i en egnet vertscelle av en rekombinant vektor ifølge oppfinnelsen som koder for nevnt antistoff (eller fragment derav) og utvinner nevnte antistoff.

30

35 Søknaden beskriver også en anordning omfattende en beholder, og en sammensetning i beholderen, hvor sammensetningen omfatter ett eller flere

CD79b-antistoffer ifølge oppfinnelsen. I en utførelsesform omfatter sammensetningen en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen. I en utførelsesform omfatter en sammensetning omfattende et antistoff ytterligere et bærestoff som i noen utførelsesformer er farmasøytisk akseptable. I en utførelsesform omfatter

5 en anordning videre anvisninger for tilførsel av sammensetningen (f.eks. antistoffet) til en pasient.

Søknaden beskriver også et analysesett omfattende en første beholder omfattende en sammensetning omfattende ett eller flere CD79b-antistoffer ifølge

10 oppfinnelsen, og en andre beholder omfattende en buffer. I en utførelsesform er bufferen farmasøytisk akseptabel. I en utførelsesform omfatter en sammensetning omfattende et antagonistantistoff videre et bærestoff som i noen utførelsesformer er farmasøytisk akseptable. I en utførelsesform omfatter et analysesett videre anvisninger for tilførsel av sammensetningen (f.eks.

15 antistoffet) til en pasient.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet anvendelse av et CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen til fremstilling av et legemiddel for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av en sykdom, slik som en krefttype, en tumor og/eller

20 en celleproliferativ forstyrrelse. I en utførelsesform er kreft, tumor og/eller celleproliferativ forstyrrelse valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL)

25 og mantelcellelymfom.

Søknaden beskriver også anvendelse av en nukleinsyre til fremstilling av et legemiddel for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av en sykdom, slik som kreft, en tumor og/eller en celleproliferativ forstyrrelse. I en utførelsesform

30 er kreft, tumor og/eller celleproliferativ forstyrrelse valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

- Søknaden beskriver også anvendelse av en ekspresjonsvektor til fremstilling av et legemiddel for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av en sykdom, slik som kreft, en tumor og/eller en celleproliferativ forstyrrelse. I en utførelsesform er kreft, tumor og/eller celleproliferativ forstyrrelse valgt fra
- 5 lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.
- 10 Søknaden beskriver også anvendelse av en vertscelle til fremstilling av et legemiddel for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av en sykdom, slik som kreft, en tumor og/eller en celleproliferativ forstyrrelse. I en utførelsesform er kreft, tumor og/eller celleproliferativ forstyrrelse valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert
- 15 indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.
- Søknaden beskriver også anvendelse av en anordning til fremstilling av et
- 20 legemiddel for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av en sykdom, slik som en krefttype, en tumor og/eller en celleproliferativ forstyrrelse. I en utførelsesform er kreft, tumor og/eller celleproliferativ forstyrrelse valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk
- 25 lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.
- Søknaden beskriver også anvendelse av et analysesett til fremstilling av et
- 30 legemiddel for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av en sykdom, slik som en krefttype, en tumor og/eller en celleproliferativ forstyrrelse. I en utførelsesform er kreft, tumor og/eller celleproliferativ forstyrrelse valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi
- 35 (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en in vitro fremgangsmåte for inhibering av veksten av en celle som uttrykker CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket forårsaker en inhibering av veksten av
5 nevnte celle. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff ifølge oppfinnelsen for anvendelse i en fremgangsmåte for terapeutisk behandling av et pattedyr som
10 har en krefttumor omfattende en celle som uttrykker CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter tilførsel til nevnte pattedyr av en terapeutisk virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket virkningsfullt behandler nevnte pattedyr. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et
15 vekstinhiberende stoff.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff ifølge oppfinnelsen for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling eller forebygging av en celleproliferativ forstyrrelse assosiert med økt CD79b-ekspresjon, idet nevnte
20 fremgangsmåte omfatter tilførsel til en pasient med behov for slik behandling av en virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket virkningsfullt behandler eller forebygger nevnte celleproliferative forstyrrelse. I en utførelsesform er nevnte proliferative forstyrrelse kreft. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet
25 konjugert til et vekstinhiberende stoff.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en in vitro fremgangsmåte for inhibering av veksten av en celle, hvor vekst av nevnte celle er minst delvis avhengig av en vekstpotensierende virkning av CD79b, idet nevnte
30 fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og en virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket inhiberer veksten av nevnte celle. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoxisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

35 I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet et antistoff ifølge oppfinnelsen for anvendelse i en fremgangsmåte for terapeutisk behandling av en tumor hos et

pattedyr, hvor veksten av nevnte tumor er minst delvis avhengig av en vekstpotensierende virkning av CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og en virkningsfull mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvilket virkningsfullt behandler nevnte tumor. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoksisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en farmasøytisk formulering for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av kreft omfattende tilførsel til en pasient av den farmasøytiske formuleringen omfattende et immunkonjugat beskrevet heri, et akseptabelt fortynningsmiddel, bærestoff eller hjelpestoff. I en utførelsesform er kreften valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom. I en utførelsesform tilføres et cytotoksisk stoff til pasienten i kombinasjon med antistofflegemiddelkonjugatforbindelsen.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en in vitro fremgangsmåte, eller anvendelse av et immunkonjugat i en terapeutisk fremgangsmåte for inhibering av B-celleproliferasjon omfattende eksponering av en celle for et immunkonjugat omfattende et antistoff ifølge oppfinnelsen under betingelser som gir mulighet for binding av immunkonjugatet til CD79b. I en utførelsesform er B-celleproliferasjonen valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom. I en utførelsesform er B-cellen et xenograft. I en utførelsesform foregår eksponeringen in vitro. I en utførelsesform foregår eksponeringen in vivo.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en fremgangsmåte for bestemmelse av forekomsten av CD79b i en prøve som antas å inneholde CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter eksponering av nevnte prøve for et antistoff ifølge oppfinnelsen, og bestemmelse av binding av nevnte antistoff til CD79b i nevnte prøve hvor binding av nevnte antistoff til CD79b i nevnte prøve er indikativ for

forekomsten av nevnte protein i nevnte prøve. I en utførelsesform er prøven en biologisk prøve. I en ytterligere utførelsesform omfatter den biologiske prøven B-celler. I en utførelsesform er den biologiske prøven fra et pattedyr som opplever eller antas å oppleve en B-celleforstyrrelse og/eller en B-celleproliferativ forstyrrelse omfattende blant annet lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

10

I et aspekt stilles det til rådighet en fremgangsmåte for diagnostisering av en celleproliferativ forstyrrelse assosiert med en økning i celler, slik som B-celler, som uttrykker CD79b, idet fremgangsmåten omfatter opprettelse av kontakt mellom testceller i en biologisk prøve og hvilke som helst av ovennevnte antistoffer, bestemmelse av nivået av antistoff bundet til testceller i prøven ved påvisning av binding av antistoffet til CD79b og sammenligning av nivået av antistoff bundet til celler i en kontrollprøve, hvor nivået av bundet antistoff er normalisert etter antallet CD79b-uttrykkende celler i testen og kontrollprøvene, og hvor et høyere nivå av antistoff bundet i testprøven sammenlignet med kontrollprøven angir forekomst av en celleproliferativ forstyrrelse assosiert med celler som uttrykker CD79b.

20

I et aspekt stilles det til rådighet en fremgangsmåte for påvisning av løselig CD79b i blod eller serum, idet fremgangsmåten omfatter opprettelse av kontakt mellom en testprøve av blod eller serum fra et pattedyr som antas å ha en B-celleproliferativ forstyrrelse, og et anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen, og påvisning av en økning i løselig CD79b i testprøven i forhold til en kontrollprøve av blod eller serum fra et normalt pattedyr. I en utførelsesform er fremgangsmåten for påvisning nyttig som en fremgangsmåte for diagnostisering av en B-celleproliferativ forstyrrelse forbundet med en økning i løselig CD79b i blod eller serum fra et pattedyr.

25

30

I et aspekt stilles det til rådighet en fremgangsmåte for binding av et antistoff ifølge oppfinnelsen til en celle som uttrykker CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter opprettelse av kontakt mellom nevnte celle og et antistoff ifølge

35

oppfinnelsen. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et cytotoksisk stoff. I en utførelsesform er antistoffet konjugert til et vekstinhiberende stoff.

- Fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen kan anvendes til å påvirke enhver egnet
- 5 patologisk tilstand, f.eks. celler og/eller vev forbundet med ekspresjon av CD79b. I en utførelsesform er en celle som er utpekt i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen, en hematopoietisk celle. En hematopoietisk celle kan for eksempel være en valgt fra gruppen bestående av en lymfocytt, en leukocytt, en blodplate, en erytrocytt og en naturlig drapscelle. I en utførelsesform er en celle som er
- 10 utpekt i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen, en B-celle eller en T-celle. I en utførelsesform er en celle som er utpekt i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen, en kreftcelle. En kreftcelle kan for eksempel være en valgt fra gruppen bestående av en lymfomcelle, en leukemicelle eller en myelomcelle.
- 15 Fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen kan videre omfatte ytterligere behandlingstrinn. I en utførelsesform omfatter en fremgangsmåte for eksempel videre et trinn hvor en utpekt celle og/eller et utpekt vev (f.eks. en kreftcelle) er eksponert for strålebehandling eller et kjemoterapeutisk stoff.
- 20 Som beskrevet heri er CD79b en signalkomponent av B-cellereseptoren. I en utførelsesform for fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen er en celle som er utpekt (f.eks. en kreftcelle), følgelig en hvor CD79b er uttrykt sammenlignet med en celle som ikke uttrykker CD79b. I en ytterligere utførelsesform er den utpekte cellen en kreftcelle hvor CD79b-ekspresjon er forsterket sammenlignet med en
- 25 normal ikke-kreftcelle av den samme vevstypen. I en utførelsesform forårsaker en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen døden for en utpekt celle.

- Også beskrevet heri er vektorer omfattende DNA som koder for ethvert av de heri beskrevne antistoffene. En vertscelle omfattende en hvilken som helst slik
- 30 vektor er også beskrevet. Som eksempel kan vertscellene være CHO-celler, E. coli-celler eller gjærceller. En fremgangsmåte for produksjon av et hvilket som helst av de heri beskrevne antistoffene stilles videre til rådighet og omfatter dyrking av vertsceller under betingelser som egner seg til ekspresjon av det ønskede antistoffet og utvinning av det ønskede antistoffet fra cellekulturen.

I enda et ytterligere aspekt vedrører oppfinnelsen en stoffsammensetning omfattende et anti-CD79b-antistoff som beskrevet heri, i kombinasjon med et bærerstoff. Bærerstoffet er eventuelt et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff.

- 5 Et annet aspekt ifølge den foreliggende oppfinnelse angår anvendelsen av et anti-CD79b-polypeptidantistoff som beskrevet heri til fremstilling av et legemiddel som er nyttig for behandling av en tilstand som reagerer på anti-CD79b-polypeptidantistoffet.
- 10 Også beskrevet heri er en sammensetning omfattende en blanding av antistofflegemiddelforbindelser med formel I hvor den gjennomsnittlige legemiddelmengden per antistoff er ca. 2 til ca. 5, eller ca. 3 til ca. 4.
- Også beskrevet heri er en farmasøytisk sammensetning omfattende en ADC-
- 15 forbindelse med formel I, en blanding av ADC-forbindelser med formel I eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav, og et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, bærerstoff eller hjelpestoff.
- Også beskrevet heri er en farmasøytisk kombinasjon omfattende en ADC-
- 20 forbindelse med formel I og en andre forbindelse med antikreftegenskaper eller andre terapeutiske virkninger.
- Også beskrevet heri er en fremgangsmåte for dreping eller inhibering av proliferasjonen av tumorceller eller kreftceller omfattende behandling av celler
- 25 med en mengde av et antistofflegemiddelkonjugat med formel 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav som er virkningsfullt for å drepe eller inhibere proliferasjonen av tumorcellene eller kreftcellene.
- Også beskrevet heri er en fremgangsmåte for behandling av kreft omfattende
- 30 tilførsel til en pasient av en terapeutisk virkningsfull mengde av en farmasøytisk sammensetning omfattende et ADC med formel I.
- Også beskrevet heri er anordninger, dvs. analysesett, omfattende et antistofflegemiddelkonjugat, en beholder og et pakningsvedlegg eller en etikett
- 35 som indikerer en behandling.

Også beskrevet heri er en fremgangsmåte for fremstilling av en antistofflegemiddelkonjugatforbindelse med formel I omfattende: a) omsetning av en konstruert cysteingruppe av det cysteinkonstruerte antistoffet med et linkerreagens for å danne antistofflinkermellomprodukt Ab-L og b) omsetning av

5 Ab-L med en aktivert legemiddelenhet D, hvorpå antistofflegemiddelkonjugatet dannes, eller omfattende: c) omsetning av en nukleofil gruppe av en legemiddelenhet med et linkerreagens for å danne legemiddellinkermellomprodukt D-L og d) omsetning av D-L med en konstruert cysteingruppe av det cysteinkonstruerte antistoffet hvorpå

10 antistofflegemiddelkonjugatet dannes.

Også beskrevet heri er et assay for påvisning av kreftceller omfattende: a) eksponering av celler for et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugat og b) bestemmelse av graden av binding av den

15 cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugatforbindelsen til cellene.

A. Anti-CD79b-antistoffer

I en utførelsesform stiller den foreliggende oppfinnelse til rådighet anti-CD79b-

20 antistoffer som kan anvendes heri som terapeutiske stoffer. Eksempler på antistoffer omfatter polyklonale, monoklonale, humaniserte og bispesifikke antistoffer samt heterokonjugatantistoffer.

1. Polyklonale antistoffer

25 Polyklonale antistoffer dyrkes fortrinnsvis hos dyr ved flere subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigenet og et hjelpestoff. Det kan være nyttig å konjugere det relevante antigenet (spesielt når syntetiske peptider anvendes) til et protein som er immunogent i den arten som skal immuniseres. Antigenet kan for eksempel konjugeres til KLH (keyhole limpet

30 hemocyanin), serumalbumin, bovint tyroglobulin eller soyabønnetrypsininhiberer ved hjelp av et bifunksjonelt eller avledende stoff, f.eks. maleimidobenzoylsulfosukkinimidester (konjugering gjennom cysteinenheter), N-

hydroksysukkinimid (gjennom lysinenheter), glutaraldehyd, sukkinianhydrid, SOCl_2 eller $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, hvor R og R^1 er forskjellige alkylgrupper.

Dyr immuniseres mot antigenet, immunogene konjugater eller derivater ved
 5 kombinasjon av for eksempel 100 μg eller 5 μg av proteinet eller konjugatet (for
 henholdsvis kaniner eller mus) med 3 volumer av Freunds komplette hjelpestoff
 og intradermal injeksjon av løsningen på flere steder. En måned senere gis
 dyrene en påfyllingsdose med 1/5 til 1/10 av den opprinnelige mengden av
 peptid eller konjugat i Freunds komplette hjelpestoff ved subkutan injeksjon på
 10 flere steder. Etter 7 til 14 dager tappes dyrene for blod, og serumet analyseres
 for antistofftiter. Dyrene får påfyllingsdoser helt til titeren flater ut. Konjugater
 kan også fremstilles i rekombinant cellekultur som proteinkondenseringer.
 Aggregerende stoffer slik som alun kan også passende anvendes til å forsterke
 immunresponsen.

15 **2. Monoklonale antistoffer**

Monoklonale antistoffer kan fremstilles ved hjelp av hybridometoden først
 beskrevet av Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), eller fremstilles ved
 rekombinante DNA-metoder (US-patent nr. 4 816 567).

20

I hybridometoden immuniseres en mus eller et annet egnet vertsdyr, slik som
 en hamster, som beskrevet ovenfor for å fremkalle lymfocytter som produserer
 eller er i stand til å produsere antistoffer som spesifikt vil binde til proteinet som
 anvendes til immunisering. Lymfocytter kan eventuelt immuniseres *in vitro*. Etter
 25 immuniseringen isoleres lymfocytene og fusjoneres deretter med en
 myelomcellelinje ved hjelp av et egnet fusjonsstoff, slik som polyetylglykol, for
 å danne en hybridomcelle (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and
 Practice, s. 59–103 (Academic Press, 1986)).

30 De således fremstilte hybridomcellene kimes og dyrkes i et egnet kulturmedium
 som fortrinnsvis inneholder én eller flere stoffer som inhiberer veksten eller
 overlevelsen av de ukondenserte, parentale myelomcellene (også betegnet som
 fusjonspartner). Hvis de parentale myelomcellene mangler enzymet
 hypoksantinguaninfosforibosyltransferase (HGPRT eller HPRT), vil det selektive
 35 kulturmediet for hybridomene typisk omfatte for eksempel hypoksantin,

aminopterin og tymidin (HAT-medium), hvor disse stoffene forhindrer veksten av HGPRT-fattige celler.

Foretrukne fusjonspartnermyelomceller er dem som fusjonerer virkningsfullt, støtter stabil høynivåproduksjon av antistoff fra de valgte antistoffproduserende cellene og er følsomme overfor et selektivt medium som velger mot de ufusjonerte parentalcellene. Foretrukne myelomcellelinjer er murine myelomlinjer, slik som dem avledet fra MOPC-21- og MPC-11-mustumorer som er tilgjengelige fra Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA og SP-2 og derivater, f.eks. X63-Ag8-653-celler som er tilgjengelige fra American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. Humane myelom- og mus-humane heteromyelomcellelinjer er også beskrevet for produksjonen av humane monoklonale antistoffer (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); og Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, s. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Kulturmedium hvor hybridomceller dyrkes, analyseres for produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot antigenet. Bindingsspesifisiteten for monoklonale antistoffer produsert av hybridomceller bestemmes fortrinnsvis ved immunutfelling eller ved et *in vitro*-bindingsassay, slik som radioimmunassay (RIA) eller enzymbundet antistoffassay (ELISA).

Bindingsaffiniteten for det monoklonale antistoffet kan for eksempel bestemmes ved hjelp av Scatchard-analysen beskrevet i Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Etter identifisering av hybridomceller som produserer antistoffer av ønsket spesifisitet, affinitet og/eller aktivitet, kan klonene subklones ved å begrense fortynningsprosedyrer og dyrkes etter standardmetoder (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, s. 59-103 (Academic Press, 1986)). Egnede kulturmedier til dette formål omfatter for eksempel D-MEM- eller RPMI-1640-medium. Hybridomceller kan videre dyrkes *in vivo* som ascites-tumorer i et dyr, f.eks. ved i.p.-tilførsel av cellene til mus.

De monoklonale antistoffene som utskilles fra subklonene, er passende separert fra kulturmediet, ascitesvæsken eller serumet ved klassiske

antistoffrensemetoder slik som for eksempel affinitetskromatografi (f.eks. ved anvendelse av protein A eller protein G-Sepharose) eller ionebyttekromatografi, hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse og lignende.

- 5 DNA som koder for monoklonale antistoffer, isoleres lett og sekvenseres ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter (f.eks. ved hjelp av oligonukleotidsonder som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for tunge og lette kjeder i murine antistoffer). Hybridomcellene tjener som den foretrukne kilde til slikt DNA. Når DNA-et er isolert, kan det plasseres i
10 ekspresjonsvektorer som deretter transfekteres til vertsceller slik som *E.coli*-celler, simian-COS-celler, CHO-celler (Chinese Hamster Ovary) eller myelomceller som ikke på annen måte produserer antistoffprotein, for å oppnå syntesen av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertscellene. Oversiktsartikler om rekombinant ekspresjon i bakterier av DNA som koder for
15 antistoffet, omfatter Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256–262 (1993) og Plückthun, Immunol. Revs. 130:151–188 (1992).

I en ytterligere utførelsesform kan monoklonale antistoffer eller antistofffragmenter isoleres fra antistoffagbiblioteker generert ved hjelp av
20 teknikker beskrevet i McCafferty et al., Nature, 348:552–554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624–628 (1991) og Marks et al., J. Mol. Biol., 212:581–597 (1991) beskriver isoleringen av henholdsvis murine og humane antistoffer ved hjelp av fagbiblioteker. Senere publikasjoner beskriver produksjonen av humane antistoffer med høy affinitet (nM-område) ved kjedeblanding (Marks et al.,
25 Bio/Technology, 10:779–783 (1992)) samt kombinatorisk infeksjon og rekombinasjon *in vivo* som en strategi for å konstruere svært store fagbibliotek (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265–2266 (1993)). Disse teknikkene er således gjennomførbare alternativer til tradisjonelle monoklonale antistoffhybridomteknikker for isolering av monoklonale antistoffer.

30

DNA-et som koder for antistoffet, kan modifiseres til å produsere kimære antistoffpolypeptider eller fusjonsantistoffpolypeptider, f.eks. ved substitusjon av humane tunge og lette kjeders konstante domene (C_H - og C_L -) sekvenser for de homologe murine sekvensene (US-patent nr. 4 816 567; og Morrison et al.,
35 Proc, Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), eller ved fusjon av immunglobulinkodingssekvensen med hele eller deler av kodingssekvensen for et

ikke-immunglobulinpolypeptid (heterologt polypeptid). Ikke-immunglobulinpolypeptidsekvensene kan være substitutter for de konstante domenene i et antistoff, eller de er substituert med de variable domenene av et antigenkombineringssted i et antistoff for å danne et kimært bivalent antistoff

5 omfattende ett antigenkombineringssted med spesifisitet for et antigen og et annet antigenkombineringssted med spesifisitet for et annet antigen.

3. Humane og humaniserte antistoffer

Anti-CD79b-antistoffene ifølge oppfinnelsen er humaniserte antistoffer.

10 Humaniserte former av ikke-humane antistoffer (f.eks. murine) er kimære immunglobuliner, immunglobulinkjeder eller fragmenter derav (slik som Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ eller andre antigenbindingsundersekvenser i antistoffer) som inneholder minimal sekvens avledet av ikke-humant immunglobulin. Humaniserte antistoffer omfatter humane immunglobuliner (mottagerantistoff)

15 hvor enheter fra en komplementær bestemmelsesregion (CDR) hos mottageren utbyttes med enheter fra en CDR hos en ikke-human art (donorantistoff), slik som mus, rotte eller kanin med ønsket spesifisitet, affinitet og kapasitet. FV-strukturenheter av det humane immunglobulinet utbyttes i enkelte tilfeller med tilsvarende ikke-humane enheter. Humaniserte antistoffer kan også omfatte

20 enheter som finnes verken i mottagerantistoffet eller i den importerte CDR-en eller strukturen. Det humaniserte antistoffet vil alminneligvis i det vesentlige omfatte alle av minst ett, og typisk to, variable domener, hvor alle eller i det vesentlige alle CDR-regionene tilsvarer dem for et ikke-humant immunglobulin og alle eller i det vesentlige alle av FR-regionene er dem for en human

25 immunglobulinkonsensussekvens. Det humaniserte antistoffet vil også optimalt omfatte minst en del av et immunglobulins konstante region (Fc), typisk den for et humant immunglobulin [Jones et al., Nature, 321:522–525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323–329 (1988), og Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593–596 (1992)].

30 Fremgangsmåter for humanisering av ikke-humane antistoffer er velkjent i teknikken. Et humanisert antistoff får alminneligvis tilført én eller flere aminosyreenheter fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyreenhetene kalles ofte "import"-enheter, som typisk tas fra et variabelt

35 "import"-domene. Humanisering kan i det vesentlige utføres ved hjelp av

fremgangsmåten til Winter og medarbeidere [Jones et al., *Nature*, 321:522–525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323–327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534–1536 (1988)], ved å substituere CDR-er eller CDR-sekvenser fra gnagere med de tilsvarende sekvensene av et humant antistoff. Slike

5 "humaniserte" antistoffer er derfor kimære antistoffer (US-patent nr. 4 816 567), hvor vesentlig mindre enn et intakt humant variabelt domene substitueres med den tilsvarende sekvensen fra en ikke-human art. Humaniserte antistoffer er i praksis typisk humane antistoffer hvor noen CDR-enheter og muligens noen FR-enheter er substituert med enheter fra analoge steder i

10 gnagerantistoffer.

Valget av humane variable domener, både lette og tunge, som skal anvendes til fremstilling av de humaniserte antistoffene, er svært viktig for å redusere antigenisitet og HAMA-respons (humant anti-mus-antistoff) når antistoffet er

15 ment for human terapeutisk anvendelse. Reduksjon eller eliminering av en HAMA-respons er et vesentlig aspekt ved klinisk utvikling av egnede terapeutiske stoffer. Se for eksempel Khaxzaeli et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et

20 al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332:323; Junghans et al., *Kreft Res.* (1990), 50:1495. Oppfinnelsen stiller som beskrevet heri til rådighet antistoffer som er humanisert slik at HAMA-responsen reduseres eller elimineres. Varianter av disse antistoffene kan videre oppnås ved hjelp av rutinemetoder som er kjent i

25 teknikken. Noen av disse er ytterligere beskrevet nedenfor. Ifølge den såkalte "best-fit"-metoden screenes sekvensen i det variable domenet i et gnagerantistoff mot hele biblioteket av kjente humane variable domenesekvenser. Den humane V-domenesekvensen som er nærmest den for en gnager, identifiseres, og den humane strukturen (FR) i den aksepteres

30 for det humaniserte antistoffet (Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). En annen fremgangsmåte anvender en særlig strukturenregion avledet av konsensussekvensen i alle humane antistoffer i en særlig undergruppe av lette eller tunge kjeder. Den samme strukturen kan anvendes for flere forskjellige humaniserte antistoffer (Carter et

35 al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

En aminosyresekvens fra et antistoff som beskrevet heri kan for eksempel tjene som en utgangssekvens (morsekvens) for diversifisering av strukturen og/eller de hypervariable sekvensene. En valgt rammeverksekvens hvortil en
 5 hypervariabel utgangssekvens er bundet, kalles heri en human akseptorstruktur. Mens de humane akseptorstrukturene kan være fra, eller avledet av, et humant immunglobulin (VL- og/eller VH-regioner derav), er de humane akseptorstrukturene fortrinnsvis fra, eller avledet av, en human konsensusrammeverksekvens, siden slike strukturer er påvist å ha minimal, eller
 10 ingen, immunogenitet hos humane pasienter.

Hvis akseptoren er avledet av et humant immunglobulin, kan man eventuelt velge en human rammeverksekvens som er valgt basert på dens homologi med donorrammeverksekvensen ved sammenstilling av donorrammeverksekvenser
 15 med forskjellige humane rammeverksekvenser i en samling av humane rammeverksekvenser, og velge den mest homologe rammeverksekvensen som akseptor.

I en utførelsesform er humane konsensusrammeverksekvenser heri fra, eller
 20 avledet av, undergruppe III VH- og/eller kappa-undergruppe I VL-konsensusrammeverksekvenser.

De humane VH-akseptorstrukturene kan således omfatte én, to, tre eller alle av følgende rammeverksekvenser:

- 25 FR1 omfattende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),
- FR2 omfattende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144),
- FR3 omfattende FR3 omfatter RFTISX₁DX₂SKNTX₃YMQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 147), hvor X₁ er A eller R, X₂ er T eller N, og X₃ er A eller L,
- FR4 omfattende WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 146).

30 Eksempler på VH-konsensusstrukturer omfatter:

human undergruppe I VH-konsensusstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 108),

- human undergruppe I VH-konsensusstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 109–111),
- human undergruppe II VH-konsensusstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 112),
- 5 human undergruppe II VH-konsensusstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 113–115),
- human undergruppe III VH-konsensusstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 116),
- 10 human undergruppe III VH-konsensusstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 117–119),
- human VH-akseptorstruktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 120),
- human VH-akseptorstruktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 121–122),
- 15 human VH-akseptor 2-struktur minus Kabat CDR-er (SEQ ID NO: 123), eller
- human VH-akseptor 2-struktur minus utvidede hypervariable regioner (SEQ ID NO: 124–126).
- 20 I en utførelsesform omfatter humane VH-akseptorstrukturer én, to, tre eller alle av følgende rammeverksekvenser:
- FR1 omfattende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),
- FR2 omfattende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144),
- FR3 omfattende RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145),
- 25 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 148),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 149),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO: 150), eller

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO: 151)

FR4 omfattende WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

5

De humane VL-akseptorstrukturene kan således omfatte én, to, tre eller alle av følgende rammeverksekvenser:

FR1 omfattende DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 139),

FR2 omfattende WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140),

10 FR3 omfattende GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141),

FR4 omfattende FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

Eksempler på VL-konsensusstrukturer omfatter:

15 human kappa-undergruppe I VL-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 127),

human kappa-undergruppe II VL-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 128),

human kappa-undergruppe III VL-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 129),
eller

human kappa-undergruppe IV VL-konsensusstruktur (SEQ ID NO: 130)

20

Mens akseptoren kan være identisk i sekvens med den valgte humane rammeverksekvensen, enten den er fra et humant immunglobulin eller en human konsensusstruktur, tenkes det i den foreliggende oppfinnelse at akseptorsekvensen kan omfatte allerede eksisterende aminosyresubstitusjoner i

25 forhold til den humane immunglobulinsekvensen eller den humane konsensusrammeverksekvensen. Disse allerede eksisterende substitusjonene er

fortrinnsvis små, vanligvis fire, tre, to eller én aminosyreforskjell bare i forhold til den humane immunglobulinsekvensen eller konsensusrammeverksekvensen.

Hypervariable regionenheter av det ikke-humane antistoffet inkorporeres i de humane VL- og/eller VH-akseptorstrukturene. Man kan for eksempel inkorporere enheter tilsvarende Kabats CDR-enheter, Chothias hypervariable sløyfeenheter, Abm-enhetene og/eller kontaktenhetene. De utvidede hypervariable regionsenhetene som følger, er eventuelt inkorporert: 24–34 (L1), 50–56 (L2) og 89–97 (L3), 26–35B (H1), 50–65, 47–65 eller 49–65 (H2) og 93–102, 94–102 eller 95–102 (H3).

Mens "inkorporering" av hypervariable regionsenheter behandles heri, er det underforstått at dette kan oppnås på forskjellige måter, f.eks. kan nukleinsyre som koder for ønsket aminosyresekvens, dannes ved mutasjon av nukleinsyre som koder for den variable domenesekvensen fra mus slik at strukturenheterne derav endres til humane akseptorstrukturenheter, eller ved mutasjon av nukleinsyre som koder for den humane variable domenesekvensen slik at de hypervariable domeneenheterne endres til ikke-humane enheter, eller ved syntetisering av nukleinsyre som koder for ønsket sekvens osv.

I eksemplene heri dannes hypervariable regionspodede varianter ved Kunkel-mutagenese av nukleinsyre som koder for humane akseptorsekvenser ved hjelp av et separat oligonukleotid for hver hypervariable region. Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367–382 (1987). Egnede endringer kan introduseres i strukturen og/eller den hypervariable regionen ved hjelp av rutineteknikker for å korrigere og gjenopprette egnede vekselvirkninger mellom hypervariable regioner og antigener.

Fag(emid)visning (heri også betegnet som fagvisning i noen sammenhenger) kan anvendes som en praktisk og rask fremgangsmåte for dannelsen og screening av mange forskjellige potensielle antistoffvarianter i et bibliotek dannet ved sekvensrandomisering. Men andre fremgangsmåter for fremstilling og screening av endrede antistoffer er tilgjengelige for fagpersoner.

Fag(emid)visningsteknologi har stilt til rådighet et kraftig verktøy for dannelsen og seleksjon av ukjente proteiner som binder til en ligand, slik som et antigen.

Anvendelse av teknikkene for fag(midt)visning gir mulighet for dannelse av store biblioteker av proteinvarianter som kan sorteres raskt for de sekvensene som binder til et målmolekyl med høy affinitet. Nukleinsyrer som koder for polypeptidvarianter, fusjoneres alminneligvis til en nukleinsyresekvens som

5 koder for et viralt kappeprotein, slik som gen-III-proteinet eller gen-VIII-proteinet. Monovalente fagemidvisningssystemer hvor nukleinsyresekvensen som koder for proteinet eller polypeptidet, kondenseres til en nukleinsyresekvens som koder for en del av det gen-III-proteinet som er utviklet. (Bass, S., Proteins, 8:309 (1990); Lowman and Wells, Methods: A

10 Companion til Methods in Enzymology, 3:205 (1991). I et monovalent fagemidvisningssystem uttrykkes genfusjonen ved lave nivåer, og villtype-gen-III-proteiner uttrykkes også slik at partiklenes infektivitet beholdes. Fremgangsmåter for dannelse av peptidbiblioteker og screening av bibliotekene er beskrevet i mange patenter (f.eks. US-patent nr. 5 723 286, US-patent nr.

15 5 432 018, US-patent nr. 5 580 717, US-patent nr. 5 427 908 og US-patent nr. 5 498 530).

Biblioteker av antistoffer eller antigenbindingspolypeptider er fremstilt på en rekke måter, herunder ved endring av et enkelt gen ved insersjon av tilfeldige

20 DNA-sekvenser eller ved kloning av en familie av relaterte gener. Fremgangsmåter for visning av antistoffer eller antigenbindingsfragmenter ved hjelp av fag(emid)visning er beskrevet i US-patent nr. 5 750 373, 5 733 743, 5 837 242, 5 969 108, 6 172 197, 5 580 717 og 5 658 727. Biblioteket screenes deretter for ekspresjon av antistoffer eller antigenbindingsproteiner med

25 ønskede karakteristikk.

Fremgangsmåter for substitusjon av en valgt aminosyre til en templatnukleinsyre er veletablert i teknikken, hvorav noen er beskrevet heri. Hypervariable regionsenheter kan for eksempel substitueres ved hjelp av

30 Kunkel-metoden. Se for eksempel Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987).

Sekvensen av oligonukleotider omfatter én eller flere av de konstruerte kodonsettene for de hypervariable regionsenhetene som skal endres. Et

35 kodonsett er et sett av forskjellige nukleotidtripltsekvenser anvendt for å kode for ønskede aminosyrevarianter. Kodonsett kan representeres ved hjelp av

symboler for å betegne særlige nukleotider eller ekvimolare blandinger av nukleotider som angitt nedenfor ifølge IUB-koden.

IUB-KODER

- G Guanin
- 5 A Adenin
- T Tymin
- C Cytosin
- R (A eller G)
- Y (C eller T)
- 10 M (A eller C)
- K (G eller T)
- S (C eller G)
- W (A eller T)
- H (A eller C eller T)
- 15 B (C eller G eller T)
- V (A eller C eller G)
- D (A eller G eller T) H
- N (A eller C eller G eller T)

- 20 I kodonsettet DVK kan D for eksempel være nukleotid A eller G eller T, V kan være A eller G eller C, og K kan være G eller T. Dette kodonsettet kan presentere 18 forskjellige kodoner og kan kode for aminosyre Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly og Cys.

- 25 Oligonukleotid- eller primersett kan syntetiseres ved hjelp av standardmetoder. Et sett av oligonukleotider kan syntetiseres for eksempel ved syntese i fast fase, inneholdende sekvenser som representerer alle mulige kombinasjoner av nukleotidtriplekker stilt til rådighet av kodonsettet og som vil kode for den ønskede aminosyregruppen. Syntese av oligonukleotider med valgt
- 30 "nukleotiddegenerasjon" ved visse posisjoner er velkjent i denne teknikken. Slike sett av nukleotider med visse kodonsett kan syntetiseres ved hjelp av kommersielle nukleinsyresyntetisorer (tilgjengelige fra for eksempel Applied Biosystems, Foster City, CA), eller kan oppnås kommersielt (f.eks. fra Life Technologies, Rockville, MD). Et sett av oligonukleotider syntetisert med et
- 35 særlig kodonsett vil derfor typisk omfatte et flertall av oligonukleotider med

forskjellige sekvenser, idet forskjellene etableres av kodonsettet i den overordnede sekvensen. Oligonukleotider som anvendt ifølge oppfinnelsen har sekvenser som tillater hybridisering til et variabelt domenes nukleinsyretemplat og kan også omfatte restriksjonsenzymsteder for kloningsformål.

5

I en fremgangsmåte kan nukleinsyresekvensene som koder for aminosyrevarianter, dannes ved oligonukleotidmediert mutagenese. Denne teknikken er velkjent i teknikken som beskrevet av Zoller et al. *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). Nukleinsyresekvenser som koder for aminosyrevarianter, dannes kort fortalt ved hybridisering av et oligonukleotidsett som koder for ønskede kodonsett til et DNA-templat, hvor templatet er den enkelttrådede formen av plasmidet inneholdende en variabel regionnukleinsyretemplatsekvens. Etter hybridisering anvendes DNA-polymerase til syntetisering av en hel andre komplementær tråd av templatet som således vil inkorporere oligonukleotidprimeren og vil inneholde kodonsettene som stilt til rådighet av oligonukleotidsettet.

Oligonukleotider på minst 25 nukleotider i lengde anvendes alminneligvis. Et optimalt oligonukleotid har 12 til 15 nukleotider som er fullstendig komplementære til templatet på hver side av nukleotidene som koder for mutasjonene. Dette sikrer at oligonukleotidet hybridiserer riktig til det enkelttrådede DNA-templatmolekylet. Oligonukleotidene syntetiseres lett ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent i teknikken, slik som den beskrevet av Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

25

DNA-templatet dannes av de vektorene som enten er avledet av bakteriofage M13-vektorer (de kommersielt tilgjengelige M13mp18- og M13mp19-vektorene er egnet), eller de vektorene som inneholder et enkelttrådet fagreplikasjonsorigin som beskrevet av Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). DNA-et som skal muteres, kan således innsettes i en av disse vektorene for å danne enkelttrådet templat. Produksjon av det enkelttrådede templatet er beskrevet i pkt. 4.21-4.41 i Sambrook et al. ovenfor.

For å endre den opprinnelige DNA-sekvensen hybridiseres oligonukleotidet til det enkelttrådede templatet under egnede hybridiseringsforhold. Et DNA-polymeriserende enzym, vanligvis T7 DNA-polymerase eller Klenow-fragmentet

35

av DNA-polymerase 1, tilsettes deretter for å syntetisere templatets komplementære tråd ved hjelp av oligonukleotidet som en primer for syntese. Et heterodupleksmolekyl dannes således slik at én tråd av DNA koder for den muterte formen av gen 1, og den andre tråden (det opprinnelige templatet) koder for den opprinnelige, uendrede sekvensen av gen 1. Dette heterodupleksmolekylet omdannes deretter til en egnet vertcelle, vanligvis et prokaryot, slik som *E. coli* JM101. Etter dyrking av cellene legges de på agaroseplater og screenes ved hjelp av oligonukleotidprimeren som er radiomerket med et 32-fosfat for å identifisere bakteriekoloniene som inneholder det muterte DNA-et.

Den umiddelbart ovenfor beskrevne fremgangsmåten kan modifiseres slik at det dannes et homodupleksmolekyl hvor begge trådene av plasmidet inneholder mutasjonene. Modifikasjonene er som følger: Det enkelttrådede oligonukleotidet annealeres til det enkelttrådede templatet som beskrevet ovenfor. En blanding av tre deoksyribonukleotider, deoksyriboadenosin (dATP), deoksyriboguanosin (dGTP) og deoksyribotymidin (dTTP) kombineres med et modifisert tiodeoksyribocytosin kalt dCTP-(aS) (som kan fås av Amersham). Denne blandingen tilsettes til templatoligonukleotidkomplekset. Ved tilsetning av DNA-polymerase til denne blandingen dannes en DNA-tråd som er identisk med templatet med unntak av de muterte basene. Denne nye DNA-tråden vil i tillegg inneholde dCTP-(aS) i stedet for dCTP, som tjener til å beskytte den fra restriksjonsendonukleasenedbryting. Etter at templattråden i det dobbelttrådede heteroduplekset er merket med et egnet restriksjonsenzym, kan templattråden nedbrytes med ExoIII-nuklease eller en annen egnet nuklease forbi regionen som inneholder stedene som skal mutageniseres. Reaksjonen stoppes deretter for å etterlate et molekyl som bare er delvis enkelttrådet. Et helt dobbelttrådet DNA-homodupleks dannes deretter ved hjelp av DNA-polymerase under nærvær av alle de fire deoksyribonukleotidtrifosfatene, ATP og DNA-ligase. Dette homodupleksmolekylet kan deretter omdannes til en egnet vertscelle.

Som tidligere angitt er oligonukleotidsettets sekvens av tilstrekkelig lengde for hybridisering til templatnukleinsyren og kan også, men ikke nødvendigvis, inneholde restriksjonssteder. DNA-templatet kan dannes av de vektorene som enten er avledet av bakteriofage M13-vektorer, eller vektorer som inneholder et enkelttrådet fagereplikasjonsorigin som beskrevet av Viera et al. Meth. Enzymol.,

153:3 (1987). DNA-et som skal muteres, må således innsettes i en av disse vektorene for å danne enkelttrådet templat. Produksjon av det enkelttrådede templatet er beskrevet i pkt. 4.21–4.41 i Sambrook *et al. ovenfor*.

- 5 Ifølge en annen fremgangsmåte kan antigenbinding gjenopprettes under humanisering av antistoffer gjennom seleksjon av reparerte hypervariable regioner (se søknad nr. 11/061,841, inngitt 18. februar 2005). Fremgangsmåten omfatter inkorporering av ikke-humane hypervariable regioner på en akseptorstruktur og videre tilførsel av én eller flere aminosyresubstitusjoner i én eller flere hypervariable regioner uten å modifisere akseptorrammeverksekvensen. Tilførselen av én eller flere aminosyresubstitusjoner kan eventuelt ledsages av modifikasjoner i akseptorrammeverksekvensen.
- 15 Ifølge en annen fremgangsmåte kan et bibliotek dannes ved å stille til rådighet oligonukleotidesett oppstrøms og nedstrøms, idet hvert sett har et flertall av oligonukleotider med forskjellige sekvenser, hvor de forskjellige sekvensene etablert av kodonsettene stilles til rådighet i oligonukleotidenes sekvens. Oligonukleotidsettene oppstrøms og nedstrøms, sammen med et variabelt domenes templatnukleinsyresekvens, kan anvendes i en polymerasekjedereaksjon for å danne et "bibliotek" av PCR-produkter. PCR-produktene kan omtales som "nukleinsyrekassetter", siden de kan fusjoneres med andre relaterte eller urelaterte nukleinsyresekvenser, f.eks. virale kappeproteiner og dimeriseringsdomener, ved hjelp av etablerte molekylbiologiteknikker.

PCR-primerenes sekvens omfatter én eller flere av de konstruerte kodonsettene for det tilgjengelige løsemiddelet og svært forskjellige posisjoner i en hypervariable region. Som beskrevet ovenfor er et kodonsett et sett av forskjellige nukleotidtriplettsekvenser anvendt til å kode for ønskede aminosyrevarianter.

Antistoffselektanter som oppfyller det ønskede kriteriet, som valgt gjennom egnede screening-/seleksjonstrinn, kan isoleres og klones ved hjelp av rekombinante standardteknikker.

Det er videre viktig at antistoffer humaniseres med retensjon av høy bindingsaffinitet for antigenet og andre gunstige biologiske egenskaper. For å nå dette målet fremstilles humaniserte antistoffer ifølge en foretrukket fremgangsmåte ved en fremgangsmåte for analyse av morsekvensene og forskjellige konseptuelle humaniserte produkter ved hjelp av tredimensjonale modeller av morsekvensene og de humaniserte sekvensene. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er vanligvis tilgjengelige og kjent for fagpersoner. Det finnes dataprogrammer som illustrerer og viser sannsynlige tredimensjonale konformasjonsstrukturer av valgte kandidatimmunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse visningene gir mulighet for analyse av den sannsynlige rollen for enhetene i kandidatimmunglobulinsekvensens funksjon, dvs. analysen av enheter som påvirker kandidatimmunglobulinets evne til å binde sitt antigen. På denne måten kan FR-enheter velges og kombineres fra mottager- og importsekvensene slik at ønsket antistoffkarakteristikk oppnås, slik som økt affinitet for målantigenene. De hypervariable regionsenhetene er alminneligvis direkte og i det mest vesentlige involvert i påvirkning av antigenbinding.

En rekke former av et humanisert anti-CD79b-antistoff er tenkt. Det humaniserte antistoffet kan for eksempel være et antistofffragment, slik som et Fab, som eventuelt er konjugert med ett eller flere cytotokiske stoffer for å danne et immunkonjugat. Det humaniserte antistoffet kan eventuelt være et intakt antistoff, slik som et intakt IgG1-antistoff.

Som et alternativ til humanisering kan det dannes humane antistoffer. Det er nå for eksempel mulig å produsere transgene dyr (f.eks. mus) som ved immunisering er i stand til å produsere et fullt repertoar av humane antistoffer under fravær av endogen immunglobulinproduksjon. Det er for eksempel beskrevet at den homozyge delesjon av antistoffets gen i den tunge kjedens koblingsregion (J_H) hos kimære og kjønnscllemutante mus resulterer i fullstendig inhibering av endogen antistoffproduksjon. Overføring av den humane immunglobulingenserien i kjønnscller til slike kjønnscllemutante mus vil resultere i produksjon av humane antistoffer ved antigenprovokasjon. Se for eksempel Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255–258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno, 7:33 (1993); US-patent nr. 5 545 806, 5 569 825, 5 591 669 (alle ved GenPharm); 5 545 807 og WO 97/17852.

Fagvisningsteknologi (McCafferty et al., Nature 348:552–553 [1990]) kan eventuelt anvendes til å produsere humane antistoffer og antistoffragmenter *in vitro* fra genrepertoarer i et immunglobulins variable (V) domene fra ikke-immuniserte donorer. Ifølge denne teknikken klones antistoffets V-domenegener i rammen til enten et større eller mindre kappeproteingen av et filamentøst bakteriofag, slik som M13 eller fd, og vises som funksjonelle antistoffragmenter på overflaten av fagpartikkelen. Siden den filamentøse partikkelen inneholder en enkelttrådet DNA-kopi av faggenomet, resulterer seleksjoner basert på antistoffets funksjonelle egenskaper også i seleksjon av genet som koder for antistoffet som viser disse egenskapene. Faget kopierer således noen av B-cellens egenskaper. Fagvisning kan utføres i en rekke formater, behandlet i for eksempel Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564–571 (1993). Flere kilder av V-gensegmenter kan anvendes til fagvisning. Clackson et al., Nature, 352:624–628 (1991) isolerte en mangfoldig serie av anti-oksazolonantistoffer fra et lite, tilfeldig kombinasjonsbibliotek av V-gener avledet fra milten hos immuniserte mus. Et repertoar av V-gener fra ikke-immuniserte humane donorer kan konstrueres, og antistoffer mot en mangfoldig serie av antigener (omfattende selv-antigener) kan isoleres i det vesentlige etter teknikkene beskrevet av Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581–597 (1991) eller Griffith et al., EMBO J. 12:725–734 (1993). Se også US-patent nr. 5 565 332 og 5 573 905.

Som drøftet ovenfor kan humane antistoffer også dannes av *in vitro*-aktiverte B-celler (se US-patent 5 567 610 og 5 229 275).

4. Antistoffragmenter

Under visse omstendigheter er det en fordel å anvende antistoffragmenter i stedet for hele antistoffer. Den mindre størrelsen på fragmentene gir mulighet for rask clearance og kan føre til forbedret tilgang til faste tumorer.

Forskjellige teknikker er utviklet for produksjon av antistoffragmenter. Disse fragmentene ble tradisjonelt avledet via proteolytisk nedbryting av intakte antistoffer (se for eksempel Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107–117 (1992) og Brennan et al., Science, 229:81

(1985)). Men disse fragmentene kan nå fremstilles direkte ved rekombinante vertsceller. Både Fab-, Fv- og ScFv-antistofffragmenter kan uttrykkes i og utskilles fra *E. coli*, hvilket således gir mulighet for enkel produksjon av store mengder av disse fragmentene. Antistofffragmenter kan isoleres fra antistoffagbibliotekene behandlet ovenfor. Fab'-SH-fragmenter kan eventuelt utvinnes direkte fra *E. coli* og kobles kjemisk for å danne F(ab')₂-fragmenter (Carter et al., Bio/Technology 10:163–167 (1992)). Ifølge en annen metode kan F(ab')₂-fragmenter isoleres direkte fra rekombinant vertscellekultur. Fab- og F(ab')₂-fragment med økt halveringstid in vivo omfattende redningsreseptorbindende epitopenheter er beskrevet i US-patent nr. 5 869 046. Andre teknikker for produksjon av antistofffragmenter vil være åpenbare for fagpersoner. I andre utførelsesformer er det valgte antistoffet et enkjedet Fv-fragment (scFv). Se WO 93/16185, US-patent nr. 5 571 894 og US-patent nr. 5 587 458. Fv og sFv er de eneste arter med intakte kombineringssteder som er frie for konstante regioner; de er således egnet til redusert ikke-spesifikk binding ved anvendelse in vivo, sFv-fusjonsproteiner kan konstrueres for å gi fusjon av et effektorprotein ved enten amino- eller karboksyterminalen av en sFv. Se Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, ovenfor. Antistofffragmentet kan også være et "lineært antistoff", f.eks. som beskrevet i US-patent 5 641 870. Slike lineære antistofffragmenter kan være monospesifikke eller bispesifikke.

5. Bispesifikke antistoffer

Bispesifikke antistoffer er antistoffer som har bindingsspesifisitet for minst to forskjellige epitoper. Eksempler på bispesifikke antistoffer kan binde til to forskjellige epitoper av et CD79b-protein som beskrevet heri. Andre slike antistoffer kan kombinere et CD79b-bindingssted med et bindingssted for et annet protein. En anti-CD79b-arm kan eventuelt kombineres med en arm som binder til et utløsende molekyl på en leukocyt, slik som et T-cellereseptormolekyl (f.eks. CD3) eller Fc-reseptorer for IgG (FcγR), slik som FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) og FcγRIII (CD16), for å fokusere og lokalisere cellulære forsvarsmekanismer til den CD79b-uttrykkende cellen. Bispesifikke antistoffer kan også anvendes til å lokalisere cytotoksiske stoffer for celler som uttrykker CD79b. Disse antistoffene har en CD79b-bindingsarm og en arm som binder det cytotoksiske stoffet (f.eks. saporin, anti-interferon-α, vinkaalkaloid, ricin-A-kjede, metotreksat eller radioaktivt isotophapten). Bispesifikke antistoffer

kan fremstilles som antistoffer av full lengde eller antistoffragmenter (f.eks. bispesifikke $F(ab')_2$ -antistoffer).

WO 96/16673 beskriver et bispesifikt anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII-antistoff, og US-
 5 patent nr. 5 837 234 beskriver et bispesifikt anti-ErbB2/anti-Fc γ RI-antistoff. Et bispesifikt anti-ErbB2/Fc α -antistoff er angitt i WO98/02463. US-patent nr. 5 821 337 beskriver et bispesifikt anti-ErbB2/anti-CD3-antistoff.

Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjent i teknikken.
 10 Tradisjonell produksjon av bispesifikke antistoffer av full lengde er basert på ko-ekspressjonen av to tungkjede/lettkjede-par fra immunglobulin, hvor de to kjedene har forskjellig spesifisitet (Millstein et al., Nature 305:537–539 (1983)). På grunn av det tilfeldige utvalget av tunge og lette kjeder fra immunglobulin produserer disse hybridomene (kvadromene) en potensiell blanding av 10
 15 forskjellige antistoffmolekyler hvor bare ett har den riktige bispesifikke strukturen. Rensing av det riktige molekylet, som vanligvis utføres ved hjelp av affinitetskromatografitrinn, er heller tungvint, og produktutbyttene er lave. Lignende fremgangsmåter er beskrevet i WO 93/08829 og i Traunecker et al., EMBO J. 10:3655–3659 (1991).

20

Ifølge en annen metode fusjoneres antistoffets variable domener med ønsket bindingsspesifisitet (kombineringssteder for antistoff/antigen) til sekvenser i immunglobulinets konstante domener. Fusjonen er fortrinnsvis med en tung kjedes konstante domene i Ig, omfattende minst en del av hengselet, C_H2- og
 25 C_H3-regioner. Det er foretrukket at den første tunge kjedens konstante region (C_H1) inneholdende stedet som er nødvendig for lettkjedebinding, er til stede i minst én av fusjonene. DNA-er som koder for fusjoner av immunglobulinets tunge kjede og om ønskelig immunglobulinets lette kjede, innsettes i separate ekspresjonsvektorer og ko-transfekteres til en egnet vertscelle. Dette stiller til
 30 rådighet større fleksibilitet ved justering av de gjensidige proporsjonene av de tre polypeptidfragmentene i utførelsesformer når ulike forhold av de tre polypeptidkjedene anvendt i konstruksjonen stiller til rådighet det ønskede bispesifikke antistoffets optimale utbytte. Det er imidlertid mulig å innsette kodingssekvensene for to eller alle de tre polypeptidkjedene i en enkelt
 35 ekspresjonsvektor når ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i like forhold

resulterer i høye utbytter, eller når forholdene ikke har noen betydelig virkning på utbyttet av den ønskede kjedekombinasjonen.

I en foretrukket utførelsesform ifølge denne metoden er de bispesifikke antistoffene sammensatt av et hybrid immunglobulins tunge kjede med en første bindingsspesifisitet i én arm, og et par av et hybrid immunglobulins tunge kjede / lette kjede (som gir en andre bindingsspesifisitet) i den andre armen. Det ble påvist at denne asymmetriske struktur letter separasjon av den ønskede bispesifikke forbindelsen fra uønskede immunglobulinkjedekombinasjoner, siden forekomsten av et immunglobulins lette kjede i bare én halvdel av det bispesifikke molekylet stiller til rådighet en enkel separeringsmåte. Denne metoden er beskrevet i WO 94/04690. Mer informasjon om dannelse av bispesifikke antistoffer finnes for eksempel i Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

15

Ifølge en annen metode beskrevet i US-patent nr. 5 731 168 kan fasegrensen mellom et par antistoffmolekyler konstrueres til å maksimere prosenten av heterodimerer som utvinnes fra rekombinant cellekultur. Den foretrukne fasegrensen omfatter minst en del av C_H3-domenet. I denne fremgangsmåten utbyttes én eller flere små aminosyresidekjeder fra fasegrensen av det første antistoffmolekylet med større sidekjeder (f.eks. tyrosin eller tryptofan). Kompensatoriske "kaviteter" med en størrelse som er identisk med eller lik de store sidekjedene, dannes på fasegrensen av det andre antistoffmolekylet ved å utbytte store aminosyresidekjeder med mindre kjeder (f.eks. alanin eller treonin). Dette stiller til rådighet en mekanisme for å øke utbyttet av heterodimerene fremfor andre uønskede sluttprodukter, slik som homodimerer.

25

Bispesifikke antistoffer omfatter kryssbundne antistoffer eller "heterokonjugat"-antistoffer. Ett av antistoffene i heterokonjugatet kan for eksempel være koblet til avidin, det andre til biotin. Slike antistoffer er for eksempel foreslått for å utpeke immune systemceller til uønskede celler (US-patent nr. 4 676 980) og for å behandle HIV-infeksjon (WO 91/00360, WO 92/200373 og EP 03089). Heterokonjugatantistoffer kan fremstilles ved hjelp av alle praktiske kryssbindingsmetoder. Egnede kryssbindingsstoffer er velkjent i teknikken og er beskrevet i US-patent nr. 4 676 980, sammen med et antall kryssbindingsteknikker.

35

Teknikker for dannelse av bispesifikke antistoffer fra antistofffragmenter er også beskrevet i litteraturen. Bispesifikke antistoffer kan for eksempel fremstilles ved hjelp av kjemisk binding. Brennan et al., Science 229:81 (1985) beskriver en fremgangsmåte hvor intakte antistoffer spaltes proteolytisk for å danne F(ab')₂-fragmenter. Disse fragmentene reduseres under fravær av det ditiolkomplekserende stoffet, natriumarsenitt, for å stabilisere vicinale ditioler og forhindre intermolekylær disulfiddannelse. De dannede Fab'-fragmentene omdannes deretter til tionitrobenzoat(TNB)-derivater. Ett av Fab'-TNB-derivatene rekonverteres deretter til Fab'-tiolet ved reduksjon med merkaptoetylamin og blandes med en ekvimolar mengde av det andre Fab'-TNB-derivatet for å danne det bispesifikke antistoffet. De fremstilte bispesifikke antistoffene kan anvendes som stoffer for den selektive immobiliseringen av enzymer.

15

Nylig fremskritt har forenklet den direkte utvinningen av Fab'-SH-fragmenter fra *E. coli*, hvilke kan kobles kjemisk for å danne bispesifikke antistoffer. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217–225 (1992) beskriver produksjonen av et fullstendig humanisert bispesifikt antistoff-F(ab')₂-molekyl. Hvert Fab'-fragment ble separat utskilt fra *E. coli* og utsatt for kjemisk kobling *in vitro* for å danne det bispesifikke antistoffet. Det således dannede bispesifikke antistoffet kunne binde til celler som overuttrykker ErbB2-reseptoren og normale humane T-celler, samt utløse den lytiske aktiviteten for humane cytotoksiske lymfocytter mot humane brysttumormål.

25

Forskjellige teknikker for fremstilling og isolering av bispesifikke antistofffragmenter direkte fra rekombinant cellekultur er også beskrevet. Bispesifikke antistoffer fremstilles for eksempel ved hjelp av leucinglidelåser. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547–1553 (1992). Leucinglidelåspeptidene fra Fos- og Jun-proteinene ble bundet til Fab'-delene av to forskjellige antistoffer ved genfusjon. Antistoffhomodimerene ble redusert ved hengselsregionen for å danne monomerer og deretter reoksidert for å danne antistoffheterodimerene. Denne fremgangsmåten kan også anvendes til produksjon av antistoffhomodimerer. "Diastoff"-teknologien beskrevet av Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444–6448 (1993) har stilt til rådighet en alternativ mekanisme for fremstilling av bispesifikke antistofffragmenter. Fragmentene

omfatter en V_H koblet til en V_L med en linker som er for kort til å tillate paring mellom de to domenene på den samme kjeden. V_H - og V_L -domenene av ett fragment tvinges derfor til å pares med de komplementære V_L - og V_H -domenene av et annet fragment, og derved danne to antigenbindingssteder. En annen strategi for fremstilling av bispesifikke antistofffragmenter ved hjelp av enkjedede Fv(sFv)-dimerer er også rapportert. Se Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Antistoffer med mer enn to valenser er behandlet. Trispesifikke antistoffer kan for eksempel fremstilles. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Heterokonjugatantistoffer

Heterokonjugatantistoffer er også omfattet av den foreliggende oppfinnelse. Heterokonjugatantistoffer er sammensatt av to kovalent bundne antistoffer. Slike antistoffer er for eksempel foreslått for å utpeke immune systemceller til uønskede celler (US-patent nr. 4 676 980) og for å behandle HIV-infeksjon (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Det er tenkt at antistoffene kan fremstilles *in vitro* ved hjelp av kjente fremgangsmåter i syntetisk proteinkjemi, herunder dem som involverer kryssbindingsstoffer. Immuntoksiner kan for eksempel konstrueres ved hjelp av en disulfidbyttereaksjon eller ved dannelsen av en tioeterbinding. Eksempler på egnede reagenser til dette formålet omfatter iminotiolat og metyl-4-merkaptobutyrimidat og dem beskrevet for eksempel i US-patent nr. 4 676 980.

7. Multivalente antistoffer

Et multivalent antistoff kan internaliseres (og/eller kataboliseres) raskere enn et bivalent antistoff ved en celle som uttrykker et antigen hvortil antistoffene binder. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan være multivalente antistoffer (som er andre enn av IgM-klassen) med tre eller flere antigenbindingssteder (f.eks. tetravalente antistoffer), som enkelt kan fremstilles ved rekombinant ekspresjon av nukleinsyre som koder for antistoffets polypeptidkjeder. Det multivalente antistoffet kan omfatte et dimeriseringsdomene og tre eller flere antigenbindingssteder. Det foretrukne

dimeriseringsdomenet omfatter (eller består av) en Fc-region eller en hengselsregion. I dette scenariet vil antistoffet omfatte en Fc-region og tre eller flere antigenbindingssteder amino-terminalt for Fc-regionen. Det foretrukne multivalente antistoffet omfatter heri (eller består av) tre til ca. åtte, men

5 fortrinnsvis fire, antigenbindingssteder. Det multivalente antistoffet omfatter minst én polypeptidkjede (og fortrinnsvis to polypeptidkjeder), hvor polypeptidkjedene omfatter to eller flere variable domener. Polypeptidkjedene kan for eksempel omfatte $VD1-(XI)^n-VD2-(X2)_n-Fc$, hvor VD1 er et første variabelt domene, VD2 er et andre variabelt domene, Fc er en polypeptidkjede

10 av en Fc-region, X1 og X2 representerer en aminosyre eller et polypeptid og n er 0 eller 1. Polypeptidkjedene kan for eksempel omfatte: VH-CH1-fleksibel linker-VH-CH1-Fc-regionkjede eller VH-CH1-VH-CH1-Fc-regionkjede. Det multivalente antistoffet heri omfatter fortrinnsvis videre minst to (og fortrinnsvis fire) polypeptider i den lette kjedens variable domene. Det multivalente antistoffet

15 heri kan for eksempel omfatte fra ca. to til ca. åtte polypeptider den lette kjedens variable domene. De her behandlede polypeptidene i den lette kjedens variable domene omfatter en lett kjedes variable domene og omfatter videre eventuelt et CL-domene.

8. Effektorfunksjonskonstruksjon

20

Det kan være ønskelig for å modifisere antistoffet ifølge oppfinnelsen med hensyn til effektorfunksjon, f.eks. for å forsterke antigenavhengig celledmediert cytotoxiskitet (ADCC) og/eller komplementere antistoffets avhengige cytotoxiskitet (CDC). Dette kan oppnås ved tilførsel av én eller flere

25 aminosyresubstitusjoner til en Fc-region i antistoffet. Cysteinenheter kan eventuelt eller i tillegg tilsettes til Fc-regionen, hvilket gir mulighet til dannelsen av interkjededisulfidbinding i denne regionen. Det således dannede homodimeriske antistoffet kan ha forbedret internaliseringsevne og/eller økt komplementmediert celledreping og antistoffavhengig celleytotoxicitet (ADCC).

30 Se Caron et al., J. Exp Med. 176:1191–1195 (1992) og Shopes. B. J. Immunol. 148:2918–2922 (1992). Homodimeriske antistoffer med forsterket anti-tumoraktivitet kan også fremstilles ved hjelp av heterobifunksjonelle kryssbindinger som beskrevet i Wolff et al., Cancer Research 53:2560–2565 (1993). Et antistoff med dobbelte Fc-regioner kan eventuelt konstrueres og kan

35 derved ha forsterket komplementlysering og bedre ADCC-evner. Se Stevenson et

al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219–230 (1989). For å øke antistoffets halveringstid i serum kan man inkorporere en redningsreseptorbindingsepitop i antistoffet (spesielt et antistoffragment) som for eksempel beskrevet i US-patent 5 739 277. Med "redningsreseptorbindingsepitop" menes som anvendt heri en epitop fra Fc-regionen i et IgG-molekyl (f.eks. IgG₁, IgG₂, IgG₃ eller IgG₄) som er ansvarlig for økning av IgG-molekylets halveringstid i serum *in vivo*.

9. Immunkonjugater

Oppfinnelsen angår også immunkonjugater (vekselvis betegnet "antistofflegemiddelkonjugater" eller "ADC-er") omfattende et antistoff konjugert til et cytotoxisk stoff, slik som et kjemoterapeutisk stoff, et vekstinhiberende stoff, et toksin (f.eks. et enzymatisk aktivt toksin av bakterie-, sopp-, plante- eller dyreopprinnelse eller fragmenter derav), eller en radioaktiv isotop (dvs. et radiokonjugat).

15

I visse utførelsesformer omfatter et immunkonjugat et antistoff og et kjemoterapeutisk stoff eller annet toksin. Kjemoterapeutiske stoffer som er nyttige for dannelsen av slike immunkonjugater, er beskrevet ovenfor. Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter derav som kan anvendes, omfatter difteri A-kjede, ikke-bindende aktive fragmenter av difteritoksin, eksotoksin A-kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A-kjede, abrin A-kjede, modeccin A-kjede, alfa-sarcin, *Aleurites fordii*-proteiner, diantin-proteiner, *Phytolaca americana*-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica carantia-inhiberer, kurcin, krotin, sapaonaria officinalis-inhiberer, gelonin, mitogellin, restriktocin, fenomycin, enomycin og trikotecenener. En rekke radionuklider er tilgjengelige for fremstilling av radiokonjugerte antistoffer. Eksempler omfatter ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y og ¹⁸⁶Re. Konjugater av antistoffet og det cytotoxiske stoffet fremstilles ved hjelp av en rekke bifunksjonelle proteinkoblingsstoffer, slik som N-sukkinimidyl-3-(2-pyridylditiol)propionat (SPDP), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladiipimidat-HCL), aktive estere (slik som disukkinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutarelddehyd), bis-azidoforbindelser (slik som bis(p-azidobenzoyl)heksanediamin), bis-diazonium-derivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som tolyen-2,6-diisocyanat) og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). Et ricinimmuntoksin kan for eksempel fremstilles som

35

beskrevet i Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Karbon-14-merket 1-isotiocyanatobenzyl-3-metyldietylentriaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksempel på et chelaterende stoff for konjugering av radionukleotid til antistoffet. Se WO94/11026.

5

Konjugater av et antistoff og én eller flere små molekyeltoksiner, slik som et kalicheamicin, auristatinpeptider, slik som monometylauristatin (MMAE) (syntetisk analog av dolastatin), maytansinoider, slik som DM1, et trikoten og CC1065, og derivatene av disse toksinene som har toksinaktivitet, er også behandlet heri.

10

Eksempler på immunkonjugater – antistofflegemiddelkonjugater

Et immunkonjugat (eller "antistofflegemiddelkonjugat" ("ADC")) ifølge oppfinnelsen kan være med formel I, nedenfor, hvor et antistoff er konjugert (dvs. kovalent bundet) til én eller flere legemiddelenheter (D) gjennom en eventuell linker (L). ADC-er kan omfatte tioMAb-legemiddelkonjugater ("TDC").

15



Antistoffet kan følgelig konjugeres til legemiddelet enten direkte eller via en linker. I formel I er p gjennomsnittlig antall legemiddelenheter per antistoff, som kan være for eksempel fra ca. 1 til ca. 20 legemiddelenheter per antistoff og i visse utførelsesformer fra 1 til ca. 8 legemiddelenheter per antistoff. Oppfinnelsen omfatter en sammensetning omfattende en blanding av antistofflegemiddelforbindelser med formel I hvor den gjennomsnittlige legemiddelmengde per antistoff er ca. 2 til ca. 5, eller ca. 3 til ca. 4.

25

a. Eksempler på linkere

En linker kan omfatte én eller flere linkerkomponenter. Eksempler på linkerkomponenter omfatter 6-maleimidokaproyl ("MC"), maleimidopropanoyl ("MP"), valin-citrullin ("val-cit" eller "vc"), alanin-fenylalanin ("ala-fe"), p-

30

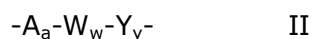
aminobenzylloksykarbonyl (en "PAB") og dem som er dannet ved konjugering med linkerreagenser: N-sukkinimidyl-4-(2-pyridyltio)pentanoat ("SPP"), N-sukkinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1 karboksylat ("SMCC", heri også betegnet "MCC") og N-sukkinimidyl(4-jod-acetyl)aminobenzoat ("SIAB").

- 5 Forskjellige linkerkomponenter er kjent i teknikken, hvorav noen er beskrevet nedenfor.

En linker kan være en "spaltbar linker" som letter frisetting av et legemiddel i cellen. En syrelabil linker (f.eks. hydrazon), proteasesensitiv linker (f.eks. peptidasesensitiv), fotolabil linker, dimetyl linker eller disulfidholdig linker (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), US-patent nr. 5 208 020) kan for eksempel anvendes.

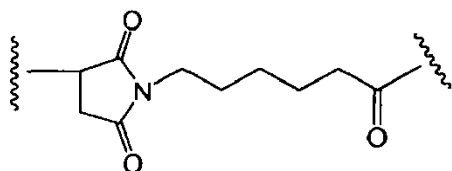
I visse utførelsesformer er en linker som angitt i følgende formel II:

15

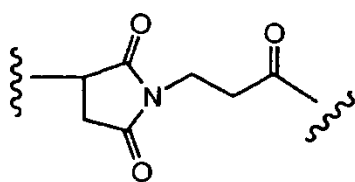


hvor A er en stretcherenhet, og a er et heltall fra 0 til 1, W er en aminosyreenhet, og w er et heltall fra 0 til 12, Y er en spacerenhet og y er 0, 1 eller 2, og Ab, D, og p er definert som ovenfor for formel I. Eksempler på utførelsesformer for slike linkere er beskrevet i US 2005-0238649 A1, hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri.

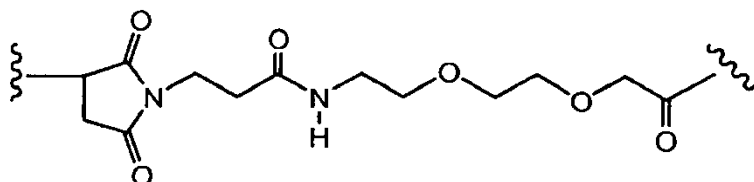
I noen utførelsesformer kan en linkerkomponent omfatte en "stretcherenhet" som binder et antistoff til en annen linkerkomponent eller til en legemiddelenhet. Eksempler på stretcherenheter er angitt nedenfor (hvor bølgelinjen angir steder med kovalent binding til et antistoff):



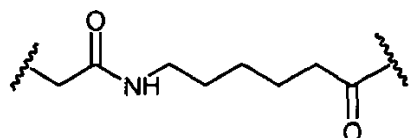
MC



MP



MPEG



5

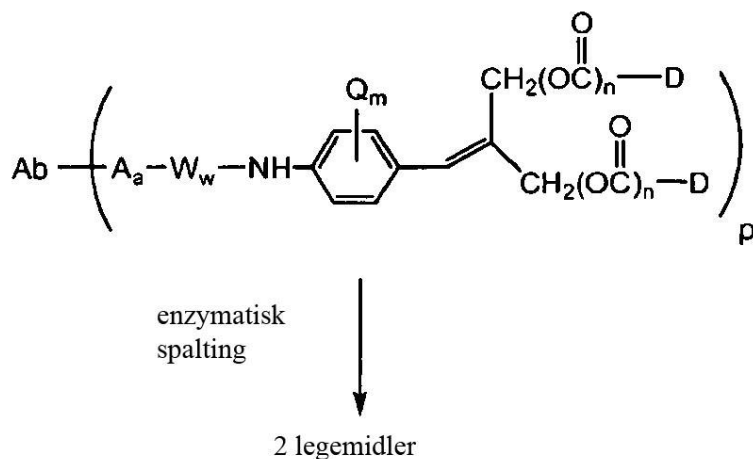
I noen utførelsesformer kan en linkerkomponent omfatte en aminosyreenhet. I én slik utførelsesform gir aminosyreenheten mulighet for spalting av linkeren ved en protease, hvilket letter frisetting av legemiddelet fra immunkonjugatet ved eksponering for intracellulære proteaser, slik som lysosomalenzymmer. Se for eksempel Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778–784. Eksempler på aminosyreenheter omfatter blant annet et dipeptid, et tripeptid, et tetrapeptid og et pentapeptid. Eksempler på dipeptider omfatter: valin-citrullin (vc eller val-cit), alanin-fenylalanin (af eller ala-phe), fenylalanin-lysin (fk eller phe-lys) eller N-metyl-valin-citrullin (Me-val-cit). Eksempler på tripeptider omfatter: glycin-valin-citrullin (gly-val-cit) og glycin-glycin-glycin (gly-gly-gly). En aminosyreenhet kan omfatte aminosyreenheter som oppstår naturlig, og mindre aminosyrer og ikke naturlig forekommende aminosyreanaloger, slik som citrullin. Aminosyreenheter kan konstrueres og optimeres i deres selektivitet for enzymatisk spalting av et særlig enzym, f.eks. en tumorassosiert protease, kathepsin B, C og D, eller en plasminprotease.

I noen utførelsesformer kan en linkerkomponent omfatte en "spacerenhet" som binder antistoffet til en legemiddelenhet, enten direkte eller ved hjelp av en

stretcherenhet og/eller en aminosyreenhet. En spacerenhet kan være "selvimmolativ" eller "ikke-selvimmolativ." En "ikke-selvimmolativ" spacerenhet er en hvor deler av eller hele spacerenheten forblir bundet til legemiddelenheten ved enzymatisk (f.eks. proteolytisk) spalting av ADC-et. Eksempler på ikke-selvimmolative spacerenheter omfatter blant annet en glycinspacerenhet og en glycine-glycinspacerenhet. Andre kombinasjoner av peptidiske spacere som er mottagelige for sekvens-spesifikk enzymatisk spalting, kan også tenkes. Enzymatisk spalting av et ADC inneholdende en glycine-glycinspacerenhet ved en tumorcelleassosiert protease vil for eksempel resultere i frisetting av en glycine-glycinelegemiddelenhet fra resten av ADC-et. I en slik utførelsesform utsettes deretter glycine-glycinelegemiddelenheten for et separat hydrolysetrinn i tumorcellen, hvorpå glycine-glycinspacerenheten spaltes fra legemiddelenheten.

En "selvimmolativ" spacerenhet gir mulighet for frisetting av legemiddelenheten uten et separat hydrolysetrinn. I visse utførelsesformer omfatter en spacerenhet for en linker en p-aminobenzylgruppen. I en slik utførelsesform er en p-aminobenzylalkohol bundet til en aminosyreenhet via en amidbinding og et karbamat, et metylkarbamat eller et karbonat fremstilles mellom benzylalkoholen og et cytotoxisk stoff. *Se for eksempel* Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103. I en utførelsesform er spacerenheten p-aminobenzyloksykarbonyl (PAB). I visse utførelsesformer substitueres fenylendelen av en p-aminobenzylgruppen med Q_m, hvor Q er -C₁-C₈-alkyl, -O-(C₁-C₈-alkyl), -halogen, -nitro eller -cyano, og m er et heltall i området fra 0 til 4. Eksempler på selvimmolative spacerenheter omfatter videre blant annet aromatiske forbindelser som er elektronisk like p-aminobenzylalkohol (se for eksempel US 2005/0256030 A1), slik som 2-aminoimidazol-5-metanolderivater (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) og orto- eller para-aminobenzylacetaler. Det kan benyttes spacere som gjennomgår syklisering ved amidbindingshydrolyse, slik som substituerte og usubstituerte 4-aminosmørsyreamidier (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223), passende substituerte bisyklo[2.2.1]- og bisyklo[2.2.2]-ringsystemer (Storm et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815) og 2-aminofenylpropionsyreamidier (Amsberry et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867). Eliminering av aminholdige legemidler som er substituert ved α-posisjonen av glycine (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447), er også eksempler på selvimmolative spacere som er nyttige i ADC-er.

I en utførelsesform er en spacerenhet en forgrenet bis(hydroksymetyl)styren(BHMS)-enhet som angitt nedenfor, hvilken kan anvendes til å inkorporere og frisette flere legemidler.

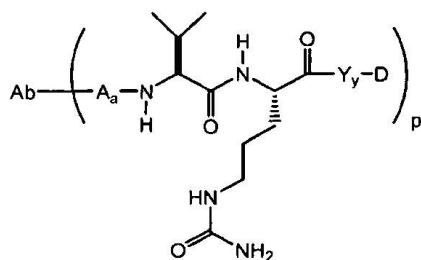


5

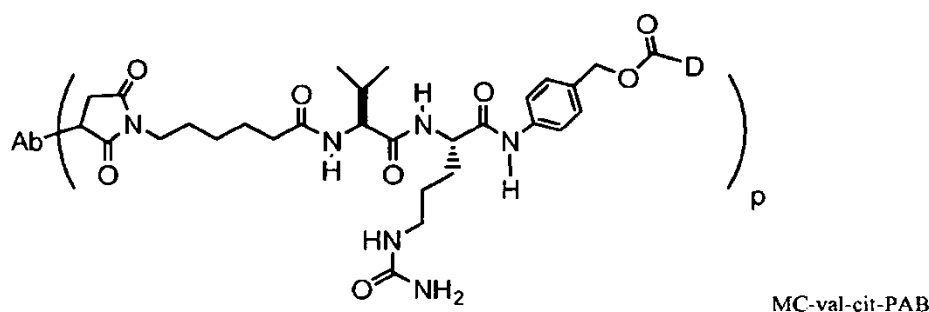
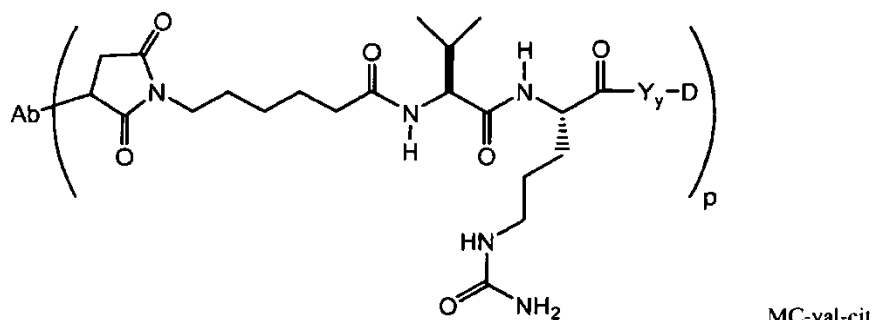
hvor Q er -C₁-C₈-alkyl, -O-(C₁-C₈-alkyl), -halogen, -nitro eller -cyano, m er et heltall i området fra 0 til 4, n er 0 eller 1 og p er fra 1 til ca. 20.

I en annen utførelsesform kan linker L være en linker av dendrittisk type for kovalent binding av mer enn én legemiddelenhet gjennom en forgrenet, multifunksjonell linkerenheter til et antistoff (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213–2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761–1768). Dendrittiske linkere kan øke molforholdet mellom legemiddel og antistoff, dvs. mengden, som er relatert til ADC-ets potens. Hvis et cysteinkonstruert antistoff bærer bare én reaktiv cysteintiolgruppe, kan en rekke legemiddelenheter således være bundet gjennom en dendrittisk linker.

Eksempler på linkerkomponenter og kombinasjoner derav er angitt nedenfor i forbindelse med ADC-er med formel II:



Val-Cit el. VC



5

Linkerkomponenter, herunder stretcher-, spacer- og aminosyreenheter, kan syntetiseres ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent i teknikken, slik som dem beskrevet i US 2005-0238649 A1.

b. Eksempler på legemiddelenheter

10 **1) Maytansin og maytansinoider**

I noen utførelsesformer omfatter et immunkonjugat et antistoff konjugert til én eller flere maytansinoidmolekyler. Maytansinoider er mitototiske inhiberer som virker ved å inhibere tubulinpolymerisering. Maytansin ble først isolert fra den østafrikanske busken *Maytenus serrata* (US-patent nr. 3 896 111). Det ble senere oppdaget at visse mikrober også produserte maytansinoider, slik som maytansinol og C-3-maytansinolestere (US-patent nr. 4 151 042). Syntetisk maytansinol og derivater og analoger derav er beskrevet for eksempel i US-patent nr. 4 137 230, 4 248 870, 4 256 746, 4 260 608, 4 265 814, 4 294 757, 4 307 016, 4 308 268, 4 308 269, 4 309 428, 4 313 946, 4 315 929, 4 317 821,

4 322 348, 4 331 598, 4 361 650, 4 364 866, 4 424 219, 4 450 254, 4 362 663 og 4 371 533.

Maytansinoidlegemiddelenheter er attraktive legemiddelenheter i
 5 antistofflegemiddelkonjugater fordi de er: i) relativt lette å fremstille ved gjæring eller kjemisk modifikasjon eller avledning av gjæringsprodukter, ii) mottagelige for avledning med funksjonelle grupper som er egnet til konjugering gjennom disulfid- og ikke-disulfidbindinger til antistoffer, iii) stabile i plasma og iv) virkningsfulle mot en rekke tumorcellelinjer.

10

Maytansinforbindelser som er egnet til anvendelse som
 maytansinoidlegemiddelenheter, er velkjent i teknikken og kan isoleres fra naturlige kilder ifølge kjente fremgangsmåter eller fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter for genkonstruksjon og gjæring (US 6790952, US
 15 2005/0170475, Yu et al (2002) PNAS 99:7968–7973). Maytansinol- og maytansinolanaloger kan også fremstilles syntetisk ifølge kjente fremgangsmåter.

Eksempler på maytansinoidlegemiddelenheter omfatter dem med en modifisert
 20 aromatisk ring, slik som: C-19-deklor (US-patent nr. 4 256 746) (fremstilt ved litiumaluminumhydridreduksjon av ansamytocin P2), C-20-hydroksy (eller C-20-demetyl) +/-C-19-deklor (US-patent nr. 4 361 650 og 4 307 016) (fremstilt ved demetylation ved hjelp av *Streptomyces* eller *Actinomyces* eller deklorinering ved LAH) og C-20-demetoksy, C-20-acyloksy (-OCOR), +/-deklor (US-patent nr.
 25 4 294 757) (fremstilt ved acylering ved hjelp av acylklorider) og dem med modifikasjoner ved andre posisjoner.

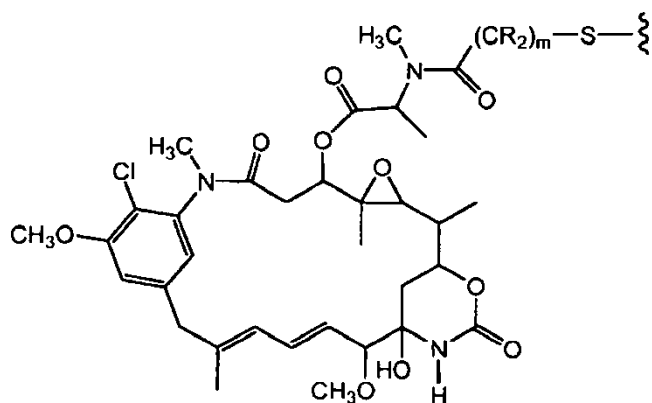
Eksempler på maytansinoidlegemiddelenheter omfatter også dem med modifikasjoner slik som: C-9-SH (US-patent nr. 4 424 219) (fremstilt ved
 30 reaksjon av maytansinol med H₂S eller P₂S₅), C-14-alkoksymetyl(demetoksy/CH₂OR)(US 4 331 598), C-14-hydroksymetyl eller acyloksymetyl (CH₂OH eller CH₂OAc) (US-patent nr. 4 450 254) (fremstilt fra Nocardia), C-15-hydroksy/acyloksy (US 4 364 866) (fremstilt ved omdannelse av maytansinol ved hjelp av streptomyces), C-15-metoksy (US-patent nr. 4 313 946 og
 35 4 315 929) (isolert fra *Trewia nudiflora*), C-18-N-demetyl (US-patent nr. 4 362 663 og 4 322 348) (fremstilt ved demetylering av maytansinol ved hjelp

av streptomycer) og 4,5-deoksy (US 4 371 533) (fremstilt ved titantriklorid/LAH-reduksjon av maytansinol).

Mange posisjoner på maytansinforbindelser er kjent for å være nyttige som
 5 bindingsposisjon, avhengig av bindingstype. For å danne en esterbinding er
 egnede posisjoner for eksempel C-3-posisjonen med en hydroksylgruppe, C-14-
 posisjonen modifisert med hydroksymetyl, C-15-posisjonen modifisert med en
 hydroksylgruppe og C-20-posisjonen med en hydroksylgruppe (US 5208020, US
 RE39151, US 6913748, US 7368565, US 2006/0167245, US 2007/0037972).

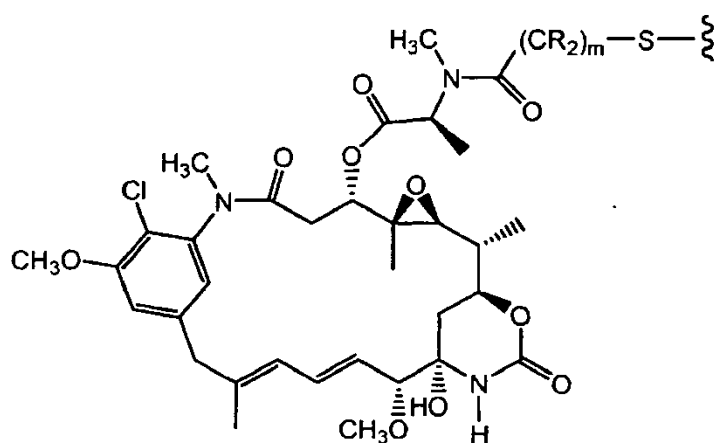
10

Maytansinoidlegemiddelenheter omfatter dem med strukturen:

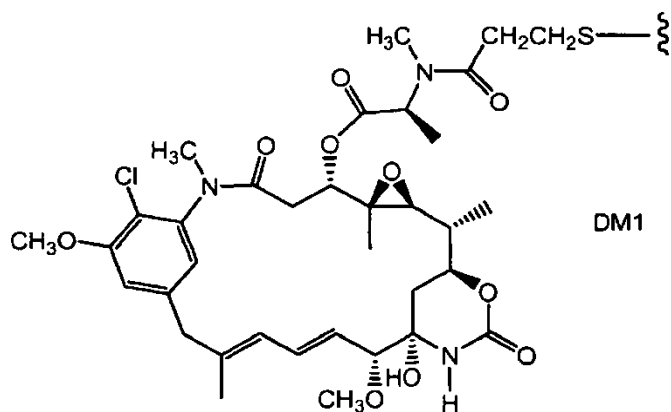


hvor bølgelinjen angir den kovalente bindingen av
 maytansinoidlegemiddelenhets svovelatom til en linker av et ADC. R kan
 15 uavhengig være H eller et C₁-C₆-alkyl. Alkylenkjeden som binder amidgruppen til
 svovelatomet, kan være metanyl, etanyl eller propyl, dvs. m er 1, 2 eller 3 (US
 633410, US 5208020, US 7276497, Chari et al (1992) Cancer Res. 52:127-131,
 Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623).

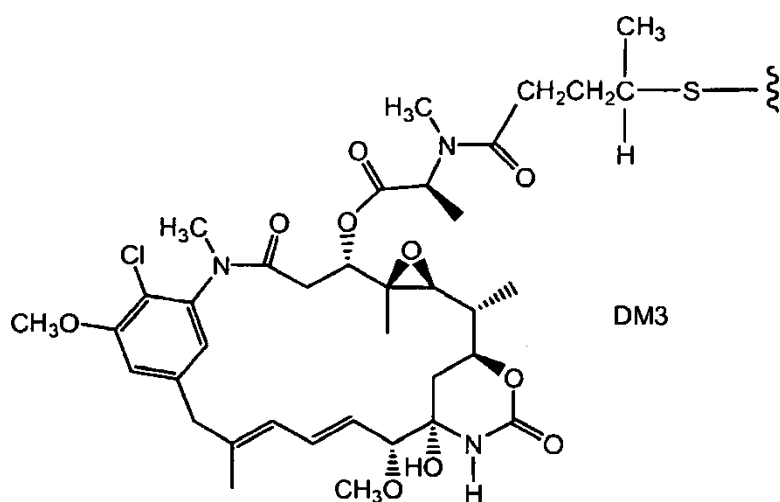
20 Alle stereoisomer av maytansinoidlegemiddelenheten er tenkt for forbindelsene
 ifølge oppfinnelsen, dvs. alle kombinasjoner av *R*- og *S*-konfigurasjoner ved de
 kirale karbonene av D. I en utførelsesform vil maytansinoidlegemiddelenheten
 ha følgende stereokjemi:



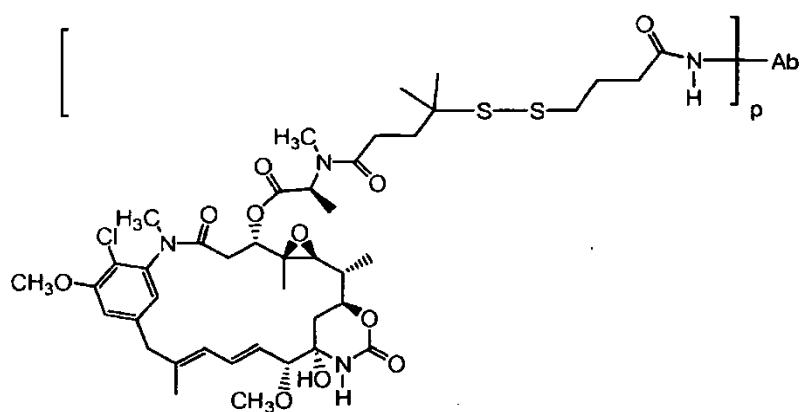
Eksempler på utførelsesformer av maytansinoidlegemiddelenheter omfatter:
DM1, DM3 og DM4 med strukturene:



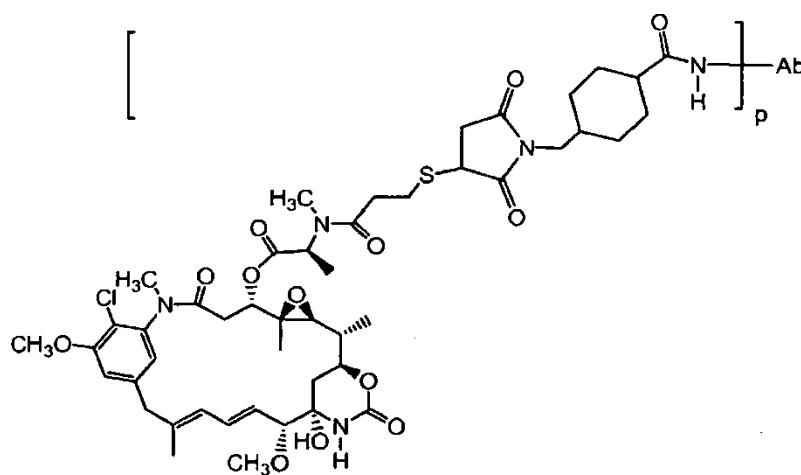
5



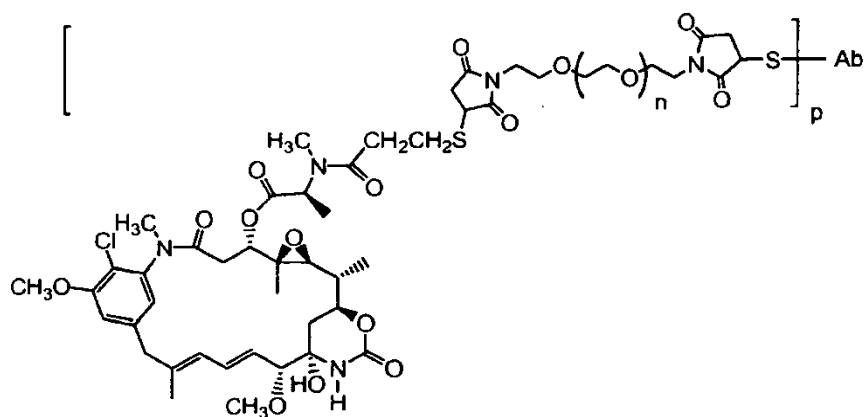
198



Ab-SPDB-DM4



- 5 Eksempler på antistofflegemiddelkonjugater hvor DM1 er bundet gjennom en BMPEO-linker til en tiolgruppe av antistoffet, har strukturen og forkortelsen:



hvor Ab er antistoff, n er 0, 1 eller 2 og p er 1,2,3 eller 4.

Immunkonjugater inneholdende maytansinoider, fremgangsmåter for fremstilling av det samme og deres terapeutiske anvendelse er beskrevet for eksempel i Erickson, et al (2006) Cancer Res. 66(8):4426–4433, US-patent nr. 5 208 020, 5 416 064, US 2005/0276812 A1 og europeisk patent EP 0 425 235 B1, hvortil
 5 det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri.

Antistoffmaytansinoidkonjugater fremstilles ved kjemisk binding av et antistoff til et maytansinoidmolekyl uten i det vesentlige å redusere den biologiske aktiviteten til enten antistoffet eller maytansinoidmolekylet. Se for eksempel US-
 10 patent nr. 5 208 020 (hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri). Maytansinoider kan syntetiseres ved hjelp av kjente fremgangsmåter eller isoleres fra naturlige kilder. Egnede maytansinoider er for eksempler beskrevet i US-patent nr. 5 208 020 og i de andre patentene og ikke-patentpublikasjonene nevnt ovenfor, slik som maytansinol og maytansinolanaloger modifisert i den
 15 aromatiske ringen eller ved andre posisjoner for maytansinolmolekylet, slik som forskjellige maytansinolesterer.

Det er mange bindingsgrupper som er kjent i teknikken for fremstilling av antistoffmaytansinoidkonjugater, herunder for eksempel dem beskrevet i US-
 20 patent nr. 5 208 020 eller EP-patent 0 425 235 B1, Chari et al. Cancer Research 52:127–131 (1992) og US 2005/016993 A1, hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri. Antistoffmaytansinoidkonjugater omfattende linkerkomponenten SMCC kan fremstilles som beskrevet i US 2005/0276812 A1, "Antibody-drug conjugates and Methods". Linkerne omfatter disulfidgrupper,
 25 tioetergrupper, syrelabile grupper, fotolabile grupper, peptidaselabile grupper eller esteraselabile grupper, som beskrevet i de ovennevnte patentene. Ytterligere linkere er beskrevet og eksemplifisert heri.

Konjugater av antistoffet og maytansinoid kan fremstilles ved hjelp av en rekke
 30 bifunksjonelle proteinkoblingsstoffer slik som N-sukkinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP), sukkinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladipimidat HCl), aktive estere (slik som disukkinimidylsüberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azido-forbindelser (slik som bis(p-
 35 azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som toluen-2,6-

diisocyanat) og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). I visse utførelsesformer er koblingsstoffet N-sukkinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723–737 (1978)) eller N-sukkinimidyl-4-(2-pyridylditio)pentanoat (SPP) for å gi mulighet for en
5 disulfidbinding.

Linkeren kan bindes til maytansinoidmolekylet i forskjellige posisjoner avhengig av bindingstypen. En esterbinding kan for eksempel dannes ved reaksjon med en hydroksylgruppe ved hjelp av klassiske koblingsteknikker. Reaksjonen kan
10 oppstå i C-3-posisjonen med en hydroksylgruppe, C-14-posisjonen modifisert med hydroksymetyl, C-15-posisjonen modifisert med en hydroksylgruppe og C-20-posisjonen med en hydroksylgruppe. I en utførelsesform dannes bindingen ved C-3-posisjonen for maytansinol eller en maytansinolanalog.

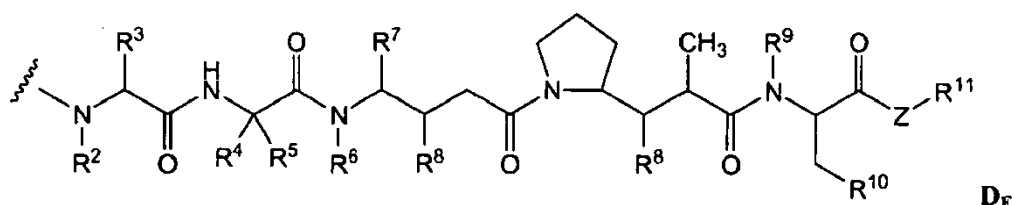
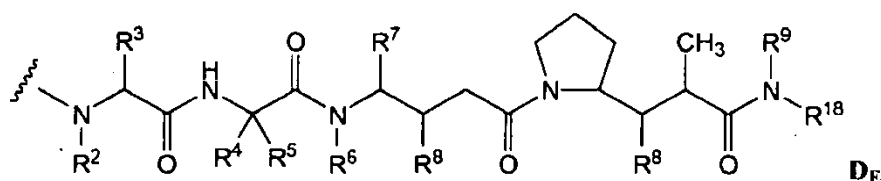
2) Auristatiner og dolastatiner

15

I noen utførelsesformer omfatter et immunkonjugat et antistoff konjugert til dolastatin eller en dolastatinpeptidisk analog eller et derivat, f.eks. en auristatin (US-patent nr. 5 635 483; 5 780 588). Dolastatiner og auristatiner er påvist å forstyrre mikrotubulodynamikk, GTP-hydrolyse og nukleær og cellulær deling
20 (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580–3584) og har antikreft- (US-patent nr. 5 663 149) og antisoppaktivitet (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961–2965). Dolastatin- eller auristatinlegemiddelenheten kan bindes til antistoffet gjennom N(amino)-terminalen eller C(karboksyl)-terminalen i den peptidiske legemiddelenheten
25 (WO 02/088172).

Eksempler på utførelsesformer for auristatin omfatter de N-terminalbundne monometylauristatinlegemiddelenhetene DE og DF (US 2005/0238649, beskrevet i Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer
30 Research, Volume 45, Abstract Number 623, fremlagt 28. mars 2004, hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri).

En peptidisk legemiddelenhet kan velges fra formel D_E og D_F nedenfor:



- 5 hvor bølgelinjen av D_E og D_F angir det kovalente bindingsstedet til et antistoff eller en antistofflinkerkomponent, og hvor det uavhengig ved hver plassering er slik at:

R^2 er valgt fra H og C_1 - C_8 -alkyl,

- 10 R^3 er valgt fra H, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_8 -karbonring, aryl, C_1 - C_8 -alkyl-aryl, C_1 - C_8 -alkyl-(C_3 - C_8 -karbonring), C_3 - C_8 -heteroring og C_1 - C_8 -alkyl-(C_3 - C_8 -heteroring),

R^4 er valgt fra H, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_8 -karbonring, aryl, C_1 - C_8 -alkyl-aryl, C_1 - C_8 -alkyl-(C_3 - C_8 -karbonring), C_3 - C_8 -heteroring og C_1 - C_8 -alkyl-(C_3 - C_8 -heteroring),

R^5 er valgt fra H og metyl,

- 15 eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbosyklisk ring med formelen - $(CR^aR^b)_n$ - hvor R^a og R^b er uavhengig valgt fra H, C_1 - C_8 -alkyl og C_3 - C_8 -karbonring og n er valgt fra 2, 3, 4, 5 og 6,

R^6 er valgt fra H og C_1 - C_8 -alkyl,

- 20 R^7 er valgt fra H, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_8 -karbonring, aryl, C_1 - C_8 -alkyl-aryl, C_1 - C_8 -alkyl-(C_3 - C_8 -karbonring), C_3 - C_8 -heteroring og C_1 - C_8 -alkyl-(C_3 - C_8 -heteroring),

R^8 i hvert tilfelle uavhengig er valgt fra H, OH, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_8 -karbonring og O-(C_1 - C_8 -alkyl),

- R^9 er valgt fra H og C_1 - C_8 -alkyl,
- R^{10} er valgt fra aryl eller C_3 - C_8 -heteroring,
- Z er O, S, NH eller NR^{12} , hvor R^{12} er C_1 - C_8 -alkyl,
- R^{11} er valgt fra H, C_1 - C_{20} -alkyl, aryl, C_3 - C_8 -heteroring, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ eller $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$,
- m er et heltall fra 1 til 1000,
- R^{13} er C_2 - C_8 -alkyl,
- R^{14} er H eller C_1 - C_8 -alkyl,
- R^{15} i hvert tilfelle uavhengig er H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$ eller $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ -alkyl,
- R^{16} i hvert tilfelle uavhengig er H, C_1 - C_8 -alkyl eller $-(CH_2)_n-COOH$,
- R^{18} er valgt fra $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -aryl, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ -heteroring) og $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ -karboring) og
- n er et heltall fra 0 til 6.
- I en utførelsesform er R^3 , R^4 og R^7 uavhengig isopropyl eller sek-butyl og R^5 er -H eller metyl. I et eksempel på en utførelsesform er både R^3 og R^4 isopropyl, R^5 er -H og R^7 er sek-butyl.
- I enda en annen utførelsesform er både R^2 og R^6 metyl og R^9 er -H.
- I enda en annen utførelsesform er R^8 i hvert tilfelle $-OCH_3$.
- I et eksempel på en utførelsesform er både R^3 og R^4 isopropyl, R^2 og R^6 er i hvert tilfelle metyl, R^5 er -H, R^7 er sek-butyl, R^8 er i hvert tilfelle $-OCH_3$ og R^9 er -H.
- I en utførelsesform er Z -O- eller -NH-.

I en utførelsesform er R^{10} aryl.

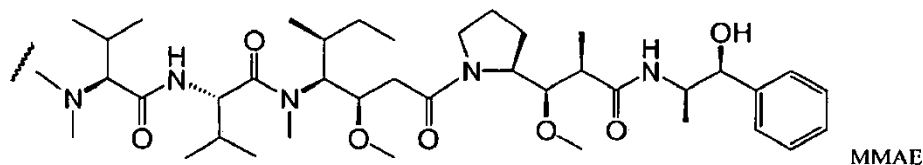
I et eksempel på en utførelsesform er R^{10} -fenyl.

- 5 I et eksempel på en utførelsesform, når Z er -O-, er R^{11} -H, metyl eller t-butyl.

I en utførelsesform, når Z er -NH-, er R^{11} -CH(R^{15})₂, hvor R^{15} er -(CH₂)_n-N(R^{16})₂ og R^{16} er -C₁-C₈-alkyl eller -(CH₂)_n-COOH.

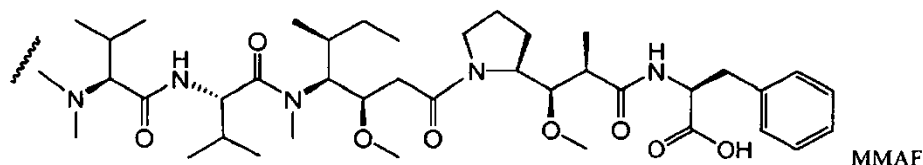
- 10 I en annen utførelsesform, når Z er -NH-, er R^{11} -CH(R^{15})₂, hvor R^{15} er -(CH₂)_n-SO₃H.

Et eksempel på en utførelsesform for auristatin med formel D_E er MMAE, hvor bølgelinjen angir den kovalente bindingen til en linker (L) av et antistofflegemiddelkonjugat:



Et eksempel på en utførelsesform for auristatin med formel D_F er MMAF, hvor bølgelinjen angir den kovalente bindingen til en linker (L) av et antistofflegemiddelkonjugat (se US 2005/0238649 og Doronina et al. (2006)

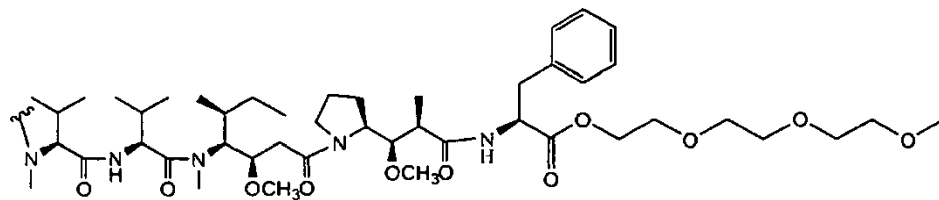
- 20 Bioconjugate Chem. 17:114–124):



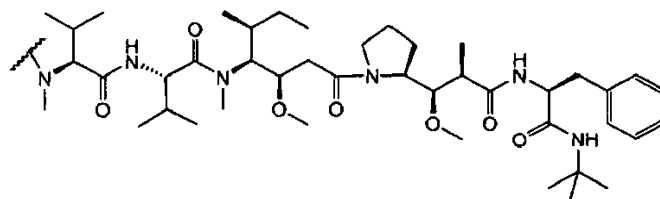
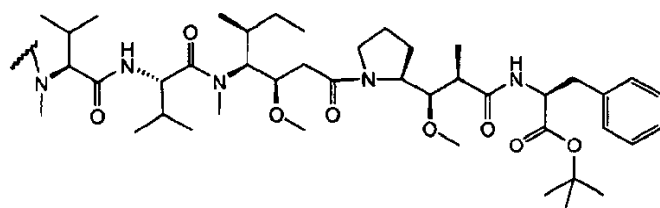
Andre eksempler på utførelsesformer omfatter monometylvalinforbindelser med fenylalaninkarboksymodifikasjoner ved C-terminalen av pentapeptidauristatinlegemiddelenheten (WO 2007/008848) og

25 monometylvalinforbindelser med fenylalaninsidekjedemodifikasjoner ved C-terminalen av pentapeptidauristatinlegemiddelenheten (WO 2007/008603).

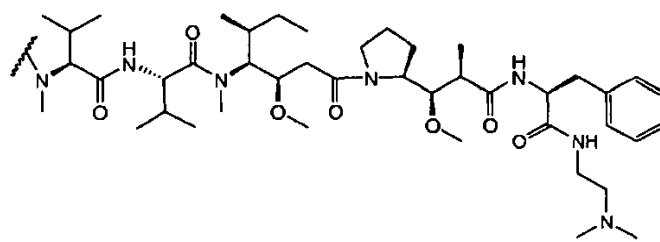
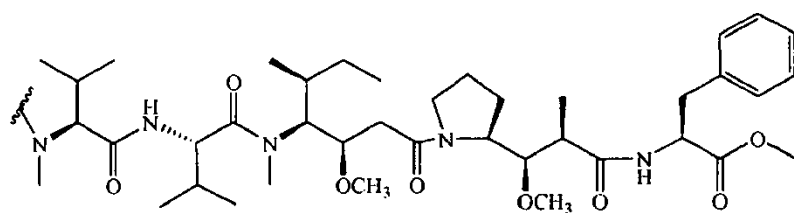
Andre legemiddelenheter omfatter følgende MMAF-derivater hvor bølgelinjen angir den kovalente bindingen til en linker (L) av et antistofflegemiddelkonjugat:



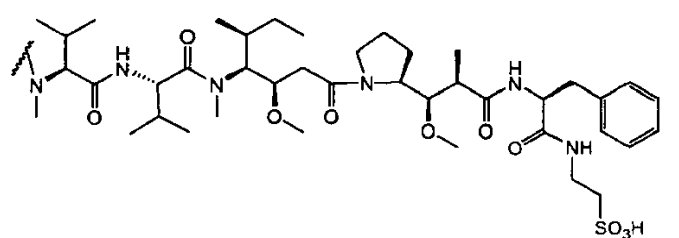
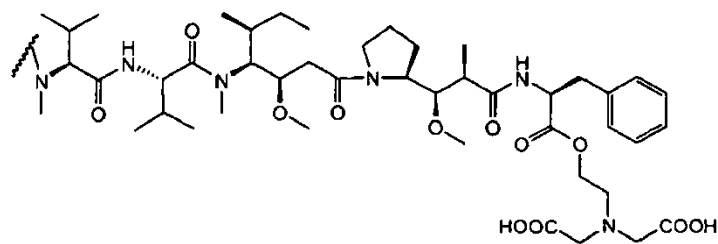
5



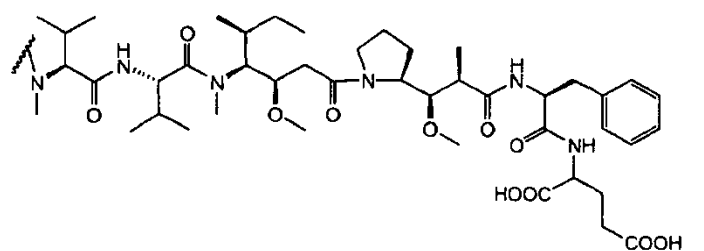
10



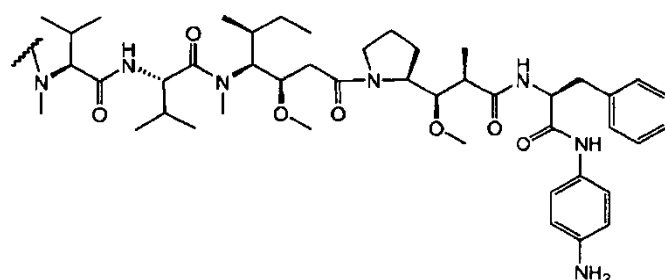
205



5



og

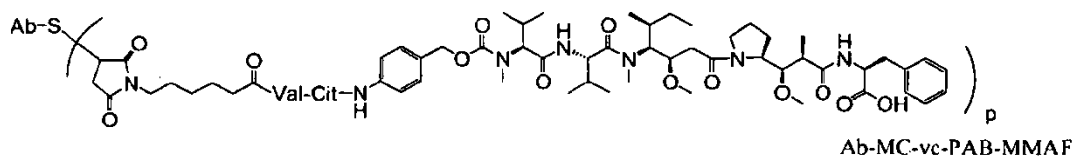


- 10 I et aspekt omfatter hydrofile grupper blant annet trietylglykolestere (TEG) som angitt ovenfor, idet disse kan bindes til legemiddelenheten ved R¹¹. Uten å være bundet av noen særlig teori bidrar de hydrofile gruppene til internalisering og ikke-agglomerering av legemiddelenheten.

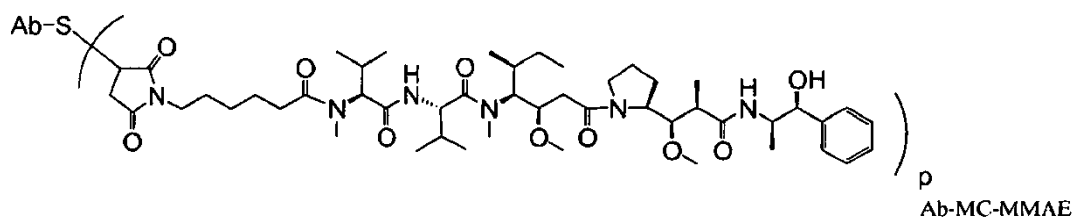
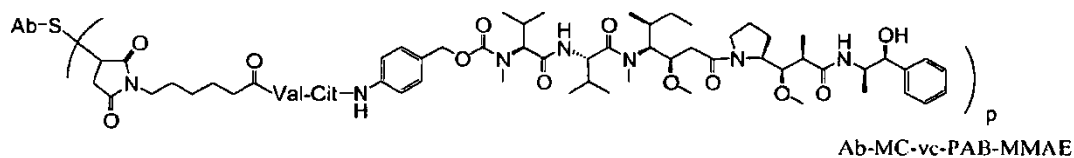
Eksempler på utførelsesformer for ADC-er med formel I omfattende et auristatin/dolastatin eller derivater derav er beskrevet i US 2005-0238649 og Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114–124, hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri. Eksempler på utførelsesformer for ADC-er med

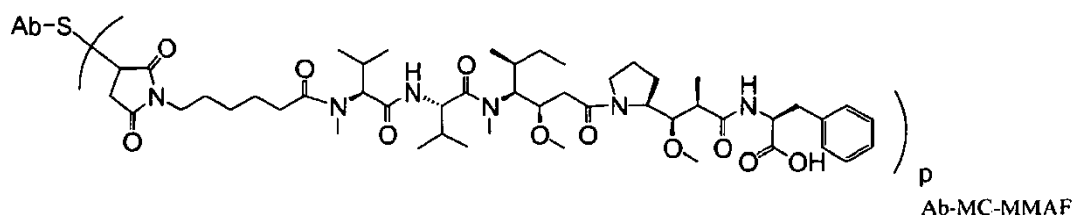
5 formel I omfattende MMAE eller MMAF og forskjellige linkerkomponenter har følgende strukturer og forkortelser (hvor "Ab" er et antistoff, p er 1 til ca. 8, "Val-Cit" eller "vc" er et valin-citrullindipeptid og "S" er et svovelatom. Det anføres at i visse deler av den strukturelle beskrivelsen av svovelbundet ADC

10 heri representeres antistoffet som "Ab-S" bare for å angi svovelbindingstrekket og ikke for å angi at et særlig svovelatom bærer flere linkerlegemiddelenheter. De venstre parentesene for følgende strukturer kan også plasseres til venstre for svovelatomet, mellom Ab og S, hvilket vil være en tilsvarende beskrivelse av ADC-et ifølge oppfinnelsen beskrevet heri.



15





Eksempler på utførelsesformer for ADC-er med formel I omfattende MMAF og forskjellige linkerkomponenter omfatter videre Ab-MC-PAB-MMAF og Ab-PAB-MMAF. Interessant nok er det påvist at immunkonjugater omfattende MMAF som er bundet til et antistoff av en linker som ikke er proteolytisk spaltbar, viser aktivitet som kan sammenlignes med immunkonjugater omfattende MMAF bundet til et antistoff av en proteolytisk spaltbar linker. Se Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114–124. I slike tilfeller antas det at legemiddelfrisetting påvirkes av antistoffnedbryting i cellen. *Id.*

10

Peptidbaserte legemiddelenheter kan typisk være fremstilt ved dannelse av en peptidbinding mellom to eller flere aminosyrer og/eller peptidfragmenter. Slike peptidbindinger kan for eksempel være fremstilt ifølge væskefasesyntesemetoden (se E. Schröder and K. Lübke "The Peptides", volume 1, s. 76–136, 1965. Academic Press) som er velkjent innenfor peptidkjemi. Auristatin-/dolastatinlegemiddelenheter kan fremstilles ifølge fremgangsmåtene i: US 2005-0238649 A1, US-patent nr. 5 635 483, US-patent nr. 5 780 588, Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463–5465, Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug-Design 13:243–277, Pettit. G.R. et al. Synthesis. 1996, 719–725, Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859–863 og Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778–784.

Auristatin-/dolastatinlegemiddelenheter med formel D_F, slik som MMAF og derivater derav, kan således fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter beskrevet i US 2005-0238649 A1 og Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem, 17:114–124. Attristatin-/dolastatinlegemiddelenheter med formel D_E, slik som MMAE og derivater derav, kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter beskrevet i Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778–784. Legemiddellinkerenheterene MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF og MC-vc-PAB-MMAE kan enkelt syntetiseres med rutinemessige fremgangsmåter, f.eks. som beskrevet i Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778–784 og patentsøknadspublikasjon nr. US 2005/0238649 A1 og deretter konjugert til et antistoff av interesse.

3) Kalicheamicin

I andre utførelsesformer omfatter immunkonjugatet et antistoff konjugert til ett eller flere kalicheamicinmolekyler. Kalicheamicinfamilien av antibiotika er i stand til å produsere dobbelttrådede DNA-brudd ved sub-pikomolare konsentrasjoner. Informasjon om fremstilling av konjugater i kalicheamicinfamilien finnes i US-patent nr. 5 712 374, 5 714 586, 5 739 116, 5 767 285, 5 770 701, 5 770 710, 5 773 001, 5 877 296 (alle til American Cyanamid Company). Strukturelle analoger av kalicheamicin som kan anvendes, omfatter blant annet γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetyl- γ_1^1 , PSAG og θ_1^1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336–3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925–2928 (1998) og de ovennevnte US-patentene til American Cyanamid). Et annet antitumorlegemiddel som antistoffet kan konjugeres til, er QFA som er et antifolat. Både kalicheamicin og QFA har intracellulære virkesteder og krysser ikke lett plasmamembranen. Cellulært opptak av disse stoffene gjennom antistoffmediert internalisering forsterker derfor deres cytotoksiske virkninger betydelig.

c. Andre cytotoksiske stoffer

Andre antitumorstoffer som kan konjugeres til et antistoff, omfatter BCNU, streptozocin, vinkristin og 5-fluoruracil, stofffamilien samlet kjent som LL-E33288-komplekset, beskrevet i US-patent nr. 5 053 394, 5 770 710 samt esperamiciner (US-patent nr. 5 877 296).

Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter derav som kan anvendes, omfatter difteri A-kjede, ikke-bindende aktive fragmenter av difteritoksin, eksotoksin A-kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A-kjede, abrin A-kjede, modeccin A-kjede, alfa-sarcin, Aleurites fordii-proteiner, diantin-proteiner, Phytolaca americana-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica charantia-inhiberer, kurcin, krotin, sapaonaria officinalis-inhiberer, gelonin, mitogellin, restriktocin, fenomycin, enomycin og trichotecener. Se for eksempel WO 93/21232 publisert 28. oktober 1993.

Den foreliggende oppfinnelse omfatter videre et immunkonjugat dannet mellom et antistoff og en forbindelse med nukleolytisk aktivitet (f.eks. en ribonuklease eller en DNA-endonuklease, slik som en deoksyribonuklease, DNase).

- 5 I visse utførelsesformer kan et immunkonjugat omfatte et svært radioaktivt atom. En rekke radioaktive isotoper er tilgjengelige for fremstilling av radiokonjugerte antistoffer. Eksempler omfatter At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} og radioaktive isotoper av Lu. Når immunkonjugatet anvendes til påvisning, kan det omfatte et radioaktivt atom for scintigrafiske
- 10 studier, f.eks. $\text{tc}^{99\text{m}}$ eller I^{123} , eller en spinmarkør for kjernemagnetisk resonanstomografi (NMR) (også kjent som magnetisk resonanstomografi, MR), slik som jod-123, jod-131, indium-111, fluor-19, karbon-13, nitrogen-15, oksygen-17, gadolinium, mangan eller jern.
- 15 Radiomarkøren eller andre markører kan inkorporeres i immunkonjugatet på kjente måter. Peptidet kan for eksempel biosyntetiseres eller kan syntetiseres ved kjemisk aminosyresyntese ved hjelp av egnede aminosyreforløpere omfattende for eksempel fluor-19 i stedet for hydrogen. Markører slik som $\text{tc}^{99\text{m}}$ eller I^{123} , Re^{186} , Re^{188} og In^{111} kan bindes via en cysteinenhet i peptidet. Yttrium-
- 20 90 kan bindes via en lysinenhet. IODOGEN-metoden (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49–57 kan anvendes til å inkorporere jod-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) beskriver andre fremgangsmåter i detalj.
- 25 I visse utførelsesformer kan et immunkonjugat omfatte et antistoff konjugert til et prolegemiddelaktiverende enzym som omdanner et prolegemiddel (f.eks. et peptidylkjemoterapeutisk stoff, se WO 81/01145) til et aktivt legemiddel, slik som et antikreftlegemiddel. Slike immunkonjugater er nyttige for antistoffavhengig enzymmediert prolegemiddelbehandling ("ADEPT"). Enzymer
- 30 som kan konjugeres til et antistoff, omfatter blant annet alkaliske fosfataser, som er nyttige for omdannelse av fosfatholdige prolegemidler til frie legemidler, arylsulfataser, som er nyttige for omdannelse av sulfatholdige prolegemidler til frie legemidler, cytosindeaminase, som er nyttig for omdannelse av ikke-toksisk 5-fluorcytosin til antikreftlegemiddelet, 5-fluoruracil, proteaser, slik som
- 35 serratiaprotease, termolysin, subtilisin, karboksypeptidaser og katepsiner (slik som katepsinene B og L), som er nyttige for omdannelse av peptidholdige

prolegemidler til frie legemidler, D-alanylkarboksypeptidaser, som er nyttige for omdannelse av prolegemidler som inneholder D-aminosyresubstituent, karbohydratspaltende enzymer slik som β -galaktosidase og neuraminidase, som er nyttig for omdannelse av glykosylerte prolegemidler til frie legemidler, β -laktamase, som er nyttig for omdannelse av legemidler avledet med β -laktamer til frie legemidler og penicillinamidaser, slik som penicillin-V-amidase og penicillin-G-amidase, som er nyttig for omdannelse av legemidler avledet av deres aminnitrogener med henholdsvis fenoksyacetyl- eller fenylacetylgrupper til frie legemidler. Enzymer kan være kovalent bundet til antistoffer ved hjelp av rekombinante DNA-fremgangsmåter som er velkjent i teknikken. Se for eksempel Neuberger et al., Nature 312:604–608 (1984).

d. Legemiddelmengde

Legemiddelmengden er representert ved p , det gjennomsnittlige antall legemiddelenheter per antistoff i et molekyl med formel I. Legemiddelmengden kan være fra 1 til 20 legemiddelenheter (D) per antistoff. ADC-er med formel I omfatter samlinger av antistoffer konjugert med en rekke legemiddelenheter, fra 1 til 20. Det gjennomsnittlige antall legemiddelenheter per antistoff i fremstillinger av ADC fra konjugeringsreaksjoner kan karakteriseres ved klassiske midler, slik som massespektroskopi, ELISA-assay og HPLC. Den kvantitative fordelingen av ADC med hensyn til p kan også bestemmes. I noen tilfeller kan separasjon, rensing og karakterisering av homogent ADC, hvor p er en bestemt verdi fra ADC med andre legemidler, oppnås ved hjelp av HPLC med omvendt fase eller elektroforese. Farmasøytiske formuleringer av antistofflegemiddelkonjugater med formel I kan således være en heterogen blanding av slike konjugater med antistoffer bundet til 1, 2, 3, 4 eller flere legemiddelenheter.

For noen antistofflegemiddelkonjugater kan p begrenses av antallet bindingssteder på antistoffet. Hvis bindingsstedet for eksempel er en cysteintiol, som i eksemplene på utførelsesformer ovenfor, kan et antistoff bare ha én eller flere cysteintiolgrupper, eller kan bare ha én eller flere tilstrekkelig reaktive tiolgrupper gjennom hvilke en linker kan bindes. I visse utførelsesformer kan større legemiddelmengder, f.eks. $p > 5$, forårsake aggregering, uoppløselighet, toksisitet eller tap av cellulær permabilitet for visse

antistofflegemiddelkonjugater. I visse utførelsesformer er legemiddelmengden for et ADC ifølge oppfinnelsen fra 1 til ca. 8, fra ca. 2 til ca. 6 eller fra ca. 3 til ca. 5. Det er faktisk påvist at for visse ADC-er kan det optimale forholdet for legemiddelenheter per antistoff være mindre enn 8 og kan være ca. 2 til ca. 5.

5 Se US 2005-0238649 A1.

I visse utførelsesformer konjugeres færre enn det teoretisk høyeste antall legemiddelenheter til et antistoff under en konjugeringsreaksjon. Et antistoff kan for eksempel inneholde lysinenheter som ikke reagerer med
 10 legemiddellinkermellomproduktet eller linkerreagenser, som behandlet nedenfor. Antistoffer inneholder alminneligvis ikke mange frie og reaktive cysteintiolgrupper som kan bindes til en legemiddelenhet, de fleste cysteintiolenhetene i antistoffer eksisterer faktisk som disulfidbroer. I visse utførelsesformer kan et antistoff reduseres med et reduksjonsstoff, slik som
 15 ditiotreitol (DTT) eller trikarbonyletylfosfin (TCEP), under delvis eller fullstendige reduksjonsforhold, for å danne reaktive cysteintiolgrupper. I visse utførelsesformer utsettes et antistoff for denatureringsforhold for å avsløre reaktive nukleofile grupper, slik som lysin eller cystein.

20 Mengden (legemiddel/antistoff-forhold) av et ADC kan kontrolleres på forskjellige måter, f.eks. ved: i) begrensning av moloverskuddet for legemiddellinkermellomproduktet eller linkerreagens i forhold til antistoff, ii) begrensning av konjugeringsreaksjonstiden eller -temperaturen og iii) delvis eller begrensende reduktive forhold for cysteintiolmodifikasjon.

25

Det er underforstått at når mer enn én nukleofil gruppe reagerer med et legemiddellinkermellomprodukt eller en linkerreagens etterfulgt av legemiddelenhetsreagens, er det resulterende produktet en blanding av ADC-forbindelser med en fordeling av én eller flere legemiddelenheter bundet til et
 30 antistoff. Det gjennomsnittlige antall legemidler per antistoff kan beregnes fra blandingen ved et dobbelt ELISA-antistoffassay, som er spesifikt for antistoffet og spesifikt for legemiddelet. Individuelle ADC-molekyler kan identifiseres i blandingen ved hjelp av massespektroskopi og separeres ved hjelp av HPLC, f.eks. hydrofob vekselvirkningskromatografi (*se for eksempel* McDonagh et al
 35 (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299–307, Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063–7070, Hamblett, K.J. et al. "Effect of drug loading on

the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27–31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting. March 27–31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). I visse utførelsesformer kan et homogent ADC med en enkelt mengdeverdi isoleres fra konjugatblandingen ved hjelp av elektroforese eller kromatografi.

10 **e. Visse fremgangsmåter for fremstilling av immunkonjugater**

Et ADC med formel I kan fremstilles ved flere ruter ved hjelp av reaksjoner, betingelser og reagenser i den organiske kjemi som er kjent for fagpersoner, herunder: 1) reaksjon av en nukleofil gruppe av et antistoff med et bivalent linkerreagens for å danne Ab-L via en kovalent binding, etterfulgt av reaksjon med en legemiddelenhet D, og 2) reaksjon av en nukleofil gruppe av en legemiddelenhet med et bivalent linkerreagens for å danne D-L via en kovalent binding, etterfulgt av reaksjon med en nukleofil gruppe av et antistoff. Eksempler på fremgangsmåter for fremstilling av et ADC med formel I via sistnevnte rute er beskrevet i US 2005-0238649 A1, hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri.

Nukleofile grupper på antistoffer omfatter blant annet: i) N-terminale amingrupper, ii) sidekjedeamingrupper, f.eks. lysin, iii) sidekjedetiolgrupper, f.eks. cystein og iv) sukkerhydroksyl- eller aminogrupper hvor antistoffet er glykosylert. Amin-, tiol- og hydroksylgrupper er nukleofile og i stand til å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkerenheter og linkerreagenser omfattende: i) aktive estere slik som NHS-estere, HOBt-estere, haloformater og syrehalider, ii) alkyl- og benzylhalider slik som haloacetamider, iii) aldehyder, ketoner, karboksyl- og maleimidgrupper. Visse antistoffer har reduserbare interkjededisulfider, dvs. cysteinbroer. Antistoffer kan gjøres reaktive for konjugering med linkerreagenser ved behandling med et reduksjonsstoff slik som DTT (ditiotreitol) eller trikarbonyletylfosfin (TCEP), slik at antistoffet blir fullstendig eller delvis redusert. Hver cysteinbro vil således teoretisk danne to reaktive tiolnukleofiler. Ytterligere nukleofile grupper kan tilføres til antistoffer

gjennom modifikasjon av lysinenheter, f.eks. ved å reagere lysineenheter med 2-iminotiolan (Trauts reagens), hvilket resulterer i omdannelse av et amin til en tiol. Reaktive tiolgrupper kan tilføres til et antistoff ved å tilføre en, to, tre, fire eller flere cysteinenheter (f.eks. ved fremstilling av antistoffvarianter omfattende

5 én eller flere ikke naturlig forekommende cysteinaminyreenheter).

Antistofflegemiddelkonjugater ifølge oppfinnelsen kan også fremstilles ved reaksjon mellom en elektrofil gruppe på et antistoff, slik som en aldehyd- eller ketonkarbonylgruppe, med en nukleofil gruppe på et linkerreagens eller et

10 legemiddel. Nyttige nukleofile grupper på et linkerreagens omfatter blant annet hydrazid, oksim, amino, hydrazin, tiosemikarbazon, hydrazinkarboksylat og arylhydrazid. I en utførelsesform er et antistoff modifisert til å tilføre elektrofile enheter som er i stand til å reagere med nukleofile substituenten på linkerreagenset eller legemiddelet. I en annen utførelsesform kan sukkeret av

15 glykosylerte antistoffer være oksidert, f.eks. med periodatoksideringsreagenser, for å danne aldehyd- eller ketongrupper som kan reagere med amingruppen av linkerreagenser eller legemiddelenheter. De resulterende imin-Schiff-basegruppene kan danne en stabil binding eller bli redusert, f.eks. ved borohydridreagenser for å danne stabile aminbindinger. I en utførelsesform kan

20 reaksjon mellom karbohydratdelen av et glykosylert antistoff og enten galaktoseoksidase eller natriummata-periodat gi karbonylgrupper (aldehyd og keton) i antistoffet som kan reagere med egnede grupper på legemiddelet (Hermanson, Bioconjugate Techniques). I en annen utførelsesform kan antistoffer inneholdende N-terminale serin- eller treoninenheter reagere med

25 natriummata-periodat, hvilket resulterer i produksjon av et aldehyd i stedet for den første aminosyren (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138–146, US 5362852). Et slikt aldehyd kan omsettes med en legemiddelenhet eller linkernukleofil.

30 Nukleofile grupper på en legemiddelenhet omfatter blant annet: amin-, tiol-, hydroksyl-, hydrazid-, oksim-, hydrazin-, tiosemikarbazon-, hydrazinkarboksylat- og arylhydrazidgrupper i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkereneheter og linkerreagenser, herunder: i) aktive estere slik som NHS-estere, HOBt-estere, haloformater og

35 syrehalider, ii) alkyl- og benzyhalider slik som haloacetamider, iii) aldehyder, ketoner, karboksyl og maleimidgrupper.

- Forbindelsene ifølge oppfinnelsen beskriver uttrykkelig blant annet ADC fremstilt med følgende krysslinkerreagenter: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-
- 5 KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC og sulfo-SMPB og SVSB (sukkinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) som er kommersielt tilgjengelige (f.eks. fra Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A, se s. 467–498, 2003–2004 Applications Handbook and Catalog.
- 10 Immunkonjugater omfattende et antistoff og et cytotoxisk stoff kan også fremstilles ved hjelp av en rekke bifunksjonelle proteinkoblingsstoffer, slik som N-sukkinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP), sukkinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladiipimidat HCl), aktive
- 15 estere (slik som disukkinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azido-forbindelser (slik som bis(p-azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diaponiumbennzoyl)-etytendiamin), diisocyanater (slik som toluen-2,6-diisocyanat) og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). Et ricinimmuntoksin kan for eksempel
- 20 fremstilles som beskrevet i Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Karbon-14-merket 1-isotiocyanatobenzyl-3-metyldietylentriaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksempel på et chelaterende stoff for konjugering av radionukleotid til antistoffet. Se WO94/11026.
- 25 Et fusjonsprotein omfattende et antistoff og et cytotoxisk stoff kan eventuelt fremstilles, f.eks. ved rekombinante teknikker eller peptidsyntese. Et rekombinant DNA-molekyl kan omfatte regioner som koder for antistoffet, og cytotoxiske deler av konjugatet som enten er tilstøtende til hverandre eller separert av en region som koder for et linkerpeptid som ikke ødelegger
- 30 konjugatets ønskede egenskaper.
- I enda en annen utførelsesform kan et antistoff være konjugert til en "reseptor" (slik som streptavidin) for anvendelse til forhåndsutpeking av tumor hvor antistoffreseptorkonjugatet tilføres til pasienten, etterfulgt av fjerning av
- 35 ubundet konjugat fra sirkulasjonen ved hjelp av et rensemiddel og deretter

tilførsel av en "ligand" (f.eks. avidin) som er konjugert til et cytotoxisk stoff (f.eks. et radionukleotid).

Eksempler på immunkonjugater - tio-antistofflegemiddelkonjugater

5 a. Fremstilling av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer

DNA som koder for en aminosyresekvensvariant av de cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffene og anti-CD79b-morantistoffene ifølge oppfinnelsen, fremstilles ved en rekke fremgangsmåter som omfatter blant annet isolering fra en naturlig kilde (ved naturlig forekommende aminosyresekvensvarianter), fremstilling av stedsrettet (eller oligonukleotidmediert) mutagenese (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-mutagenese (Higuchi, (1990) in PCR Protocols, s. 177–183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67–70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126–132; og Vallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723–733) og kassettmutagenese (Wells et al (1985) Gene 34:315–323) av et tidligere fremstilt DNA som koder for polypeptidet. Mutageneseprotokoller, -analysesett og -reagenser er kommersielt tilgjengelige, f.eks. QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Enkle mutasjoner dannes også ved oligonukleotidrettet mutagenese ved hjelp av dobbelttrådet plasmid-DNA som templat ved PCR-basert mutagenese (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). Varianter av rekombinante antistoffer kan konstrueres også ved restriksjonsfragmentmanipulering eller OE-PCR med syntetiske oligonucleotider. Mutagene primere koder for cysteinkodonutbyttinger. Alminnelige mutageneseteknikker kan benyttes til å danne DNA som koder for slike mutante cysteinkonstruerte antistoffer (Sambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; og Ausubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993).

Fagvisningsteknologi (McCafferty et al (1990) Nature 348:552–553) kan anvendes til å produsere humane anti-CD79b-antistoffer og antistofffragmenter *in vitro* fra genrepertoaret i et immunglobulins variable (V) domene fra uimmuniserte donorer. Ifølge denne teknikken klones antistoffets V-domenegener i rammen til enten et større eller mindre kappeproteingen av et filamentøst bakteriofag, slik som M13 eller fd, og vises som funksjonelle antistofffragmenter på overflaten av fagpartikkelen. Siden den filamentøse partikkelen inneholder en enkelttrådet DNA-kopi av faggenomet, resulterer seleksjoner basert på antistoffets funksjonelle egenskaper også i seleksjon av genet som koder for antistoffet som viser disse egenskapene. Faget kopierer således noen av B-cellens egenskaper (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).

Anti-CD79b-antistoffer kan syntetiseres kjemisk ved kjent oligopeptidsyntesemetode eller fremstilles og renses ved rekombinant teknologi. Den relevante aminosyresekvensen, eller deler derav, kan fremstilles av direkte peptidsyntese ved hjelp av fastfaseteknikker (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149–2154). *Proteinsyntese in vitro* kan utføres ved hjelp av manuelle teknikker eller automasjon. Automatisert fastfasesyntese kan oppnås for eksempel ved hjelp av t-BOC- eller Fmoc-beskyttede aminosyrer og ved hjelp av en peptidsyntetisator fra Applied Biosystems (Foster City, CA) som brukes etter produsentens bruksanvisning. Forskjellige deler av anti-CD79b-antistoffet eller CD79b-polypeptidet kan syntetiseres separat kjemisk og kombineres ved hjelp av kjemiske eller enzymatiske fremgangsmåter for å produsere det ønskede anti-CD79b-antistoffet eller CD79b-polypeptidet.

Forskjellige teknikker er utviklet for produksjon av antistofffragmenter. Disse fragmentene ble tradisjonelt avledet via proteolytisk nedbryting av intakte antistoffer (Morimoto et al (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107–117; og Brennan et al (1985) Science, 229:81), eller fremstilt direkte av rekombinante vertsceller. Både Fab-, Fv- og ScFv-anti-CD79b-antistofffragmenter kan uttrykkes i og utskilles fra *E. coli*, hvilket således gir

mulighet for enkel produksjon av store mengder av disse fragmentene. Antistofffragmenter kan isoleres fra antistoffbibliotekene behandlet heri. Fab'-SH-fragmenter kan eventuelt utvinnes direkte fra *E. coli* og kobles kjemisk for å danne F(ab')₂-fragmenter (Carter et al (1992) Bio/Technology 10:163-167),
 5 eller isoleres direkte fra rekombinant vertscellekultur. Anti-CD79b-antistoffet kan være et (scFv) enkjedet Fv-fragment (WO 93/16185; US 5571894; US. 5587458). Anti-CD79b-antistofffragmentet kan også være et "lineært antistoff" (US 5641870). Slike lineære antistofffragmenter kan være monospesifikke eller bispesifikke.

10

Beskrivelsen nedenfor angår primært produksjon av anti-CD79b-antistoffer ved dyrking av celler omdannet eller transfektert med en vektor inneholdende anti-CD79b-antistoffkodende nukleinsyre. DNA som koder for anti-CD79b-antistoffer, kan oppnås fra et cDNA-bibliotek fremstilt av vev som antas å inneholde anti-
 15 CD79b-antistoff-mRNA og uttrykke det på et påvisbart nivå. Humant anti-CD79b-antistoff eller CD79b-polypeptid-DNA kan følgelig enkelt oppnås fra et cDNA-bibliotek fremstilt fra humant vev. Det anti-CD79b-antistoffkodende genet kan også oppnås fra et genomisk bibliotek eller ved kjente syntetiske prosedyrer (f.eks. automatisert nukleinsyresyntese).

20

Fremgangsmåtene for konstruksjon, seleksjon og fremstilling ifølge oppfinnelsen gir mulighet for cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer som er reaktive med elektrofil funksjonalitet. Disse fremgangsmåtene gir videre mulighet for antistoffkonjugatforbindelser slik som antistofflegemiddelkonjugatforbindelser
 25 (ADC) med legemiddelmolekyler på utpekte, konstruerte, selektive steder. Reaktive cysteinheter på en antistoffoverflate gir mulighet for spesifikk konjugering av en legemiddelenhet gjennom en tiolreaktiv gruppe slik som maleimid eller haloacetyl. Den nukleofile reaktiviteten til en Cys-enhets tiolfunksjonalitet overfor en maleimidgruppe er ca. 1000 ganger høyere enn
 30 enhver annen aminosyrefunksjonalitet i et protein, slik som aminogruppen av lysin enheter eller den N-terminale aminogruppen. Tiolspesifikk funksjonalitet i jodacetyl- og maleimidreagenser kan reagere med aminogrupper, men høyere pH (> 9,0) og lengre reaksjonstider kreves (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). Mengden av fritt tiol i
 35 et protein kan anslås med det alminnelige Ellmans assay. Immunglobulin M er et eksempel på en disulfidbundet pentamer, mens immunglobulin G er et eksempel

på et protein med interne disulfidbroer som binder underenhetene sammen. I slike proteiner kreves reduksjon av disulfidbindingene med et reagens slik som ditiotreitol (DTT) eller selenol (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147–156) for å danne det reaktive frie tiolet. Denne metoden kan resultere i tap av
5 antistofftertiærstruktur og antigenbindingsspesifisitet.

PHASELECTOR-assayet (fag-ELISA for seleksjon av reaktive tioler) gir mulighet for påvisning av reaktive cysteingroupper i antistoffer i et ELISA-fagformat, hvilket bidrar til konstruksjonen av cysteinkonstruerte antistoffer (Junutula, J.R.
10 et al. (2008) J Immunol Methods 332:41–52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). Det cysteinkonstruerte antistoffet er belagt på veggoverflater, etterfulgt av inkubering med fagpartikler, tilsetning av HRP-merket sekundært antistoff og absorbanspåvisning. Mutantproteiner vist på faget kan screenes på en hurtig, robust måte med høy gjennomstrømning. Biblioteker av
15 cysteinkonstruerte antistoffer kan fremstilles og utsettes for bindingsseleksjon ved hjelp av samme metode for å identifisere hensiktsmessig reaktive steder med fri Cys-inkorporering fra tilfeldige proteinfagbiblioteker av antistoffer eller andre proteiner. Denne teknikken omfatter omsetning av cysteinmutantproteiner vist på faget med et affinitetsreagens eller en reportergruppe som også er
20 tiolreaktiv.

PHASELECTOR-assayet gir mulighet for screening av reaktive tiolgrupper i antistoffer. Identifisering av A121C-varianten ifølge denne fremgangsmåten er et eksempel. Hele Fab-molekylet kan effektivt gjennom søkes for å identifisere flere
25 tioFab-varianter med reaktive tiolgrupper. En parameter, fraksjonsoverflatetilgjengelighet, ble anvendt til å identifisere og kvantitere løsemiddelets tilgjengelighet til aminosyreenhetene i et polypeptid. Overflatetilgjengeligheten kan være uttrykt som arealet ($\text{\AA}^2$) som kan være kontaktet av et løsemiddelmolekyl, f.eks. vann. Det anvendte arealet av vann er
30 tilnærmet som en sfære med radius på 1,4 Å. Programvare er fritt tilgjengelig eller lisensbart (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, faks: (+44) 1925 603825, eller Internett: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) som CCP4-serien av krystallografiprogrammer som benytter algoritmer til å beregne
35 overflatetilgjengeligheten for hver aminosyre av et protein med kjente røntgenkrystallografiavledede koordinater ("The CCP4 Suite: Programs for

Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760–763). To eksempler på programvaremoduler som utfører beregninger av overflatetilgjengelighet, er "AREAIMOL" og "SURFACE", basert på algoritmene av B.Lee og F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379–400. AREAIMOL definerer løsemiddelets tilgjengelige overflate på et protein som stedet for en sondesfæres senter (representerer et løsemiddelmolekyl) etter hvert som det ruller over proteinets Van der Waals-overflate. AREAIMOL beregner løsemiddelets tilgjengelige overflate ved dannelse av overflatepunkter på en utvidet sfære rundt hvert atom (i en avstand fra atomsenteret tilsvarende summen av atomets og sondens radier), og eliminering av dem som ligger innenfor tilsvarende sfærer assosiert med tilstøtende atomer. AREAIMOL finner løsemiddelets tilgjengelige areal av atomer i en PDB-koordinatfil og sammenfatter det tilgjengelige arealet etter enhet, etter kjede og for hele molekylet. Tilgjengelige arealer (eller arealforskjeller) for enkeltatomer kan skrives til en pseudo-PDB-utdatafil. AREAIMOL forutsetter en enkelt radius for hvert element, og gjenkjenner bare et begrenset antall forskjellige elementer.

AREAIMOL og SURFACE rapporterer absolutte tilgjengeligheter, dvs. antallet kvadratångström (Å). Fraksjonell overflatetilgjengelighet beregnes ved henvisning til en standardtilstand som er relevant for en aminosyre i et polypeptid. Referansetilstanden er tripeptid-Gly-X-Gly, hvor X er aminosyren av interesse, og referansetilstanden bør være en "utvidet" konformasjon, dvs. som dem i betraktning. Den utvidede konformasjonen maksimerer tilgjengeligheten for X. Et beregnet tilgjengelig areal deles med det tilgjengelige arealet i en Gly-X-Gly-tripeptidreferansetilstand og rapporterer kvotienten, som er den fraksjonelle tilgjengeligheten. Prosentvis tilgjengelighet er fraksjonell tilgjengelighet multiplisert med 100. En annen eksempelalgoritme for beregning av overflatetilgjengelighet er basert på program-XSAE-ets SOLV-modul (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel) som beregner en aminosyreenhets fraksjonelle tilgjengelighet for en vannsfære basert på polypeptidets røntgenkoordinater. Den fraksjonelle overflatetilgjengeligheten for hver aminosyre i et antistoff kan beregnes ved hjelp av tilgjengelig krystallstrukturinformasjon (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969–995).

DNA som koder cysteinkonstruerte antistoffer, isoleres enkelt og sekvenseres ved hjelp av klassiske prosedyrer (f.eks. ved hjelp av oligonukleotidsonder som

kan binde spesifikt til gener som koder for de tunge og lette kjedene i murine antistoffer). Hybridomcellene fungerer som en kilde til slikt DNA. Straks DNA-et er isolert, kan det plasseres i ekspresjonsvektorer, som deretter transfekteres til vertsceller slik som E. coli-celler, COS-celler fra aper, CHO-celler (Chinese Hamster Ovary), eller andre vertsceller fra pattedyr, slik som myelomceller (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) som ellers ikke produserer antistoffproteinet, for å oppnå syntesen av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertscellene.

- 10 Etter konstruksjon og seleksjon kan cysteinkonstruerte antistoffer, f.eks. tioFabs, med de konstruerte, svært reaktive uparede Cys-enhetene, de "frie cysteinaminosyrene", fremstilles ved: i) ekspresjon i et bakteriesystem, f.eks. E. coli-system (Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262; Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188) eller et system for cellekultur fra pattedyr (WO 01/00245), f.eks. CHO-celler (Chinese Hamster Ovary), og ii) rensing ved hjelp av vanlige proteinrenseteknikker (Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988).

- 20 De konstruerte Cys-tiolgruppene reagerer med elektrofile linkerreagenser og legemiddellinkermellomprodukter for å danne cysteinkonstruerte antistofflegemiddelkonjugater og andre merkede cysteinkonstruerte antistoffer. Cys-enheter av cysteinkonstruerte antistoffer, til stede i morantistoffene, som pares og danner interkjede- og intrakjededisulfidbindinger, har ikke noen reaktive tiolgrupper (med mindre de er behandlet med et reduksjonsstoff) og reagerer ikke med elektrofile linkerreagenser eller legemiddellinkermellomprodukter. Den nykonstruerte Cys-enheten kan forbli uparet, og kan reagere med, dvs. konjugere til, et elektrofilt linkerreagens eller legemiddellinkermellomprodukt, slik som et legemiddelmaleimid. Eksempler på legemiddellinkermellomprodukter omfatter: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE og MC-vc-PAB-MMAF. De konstruerte Cys-enhetenes strukturposisjoner i de tunge og lette kjedene er nummerert ifølge et sekvensnummereringssystem. Dette sekvensnummereringssystemet er korrelert til Kabat-nummereringssystemet (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) fra N-terminalen og skiller seg fra Kabat-nummereringssystemet (nedre rad) ved insersjoner angitt ved a,b,c. Ved hjelp

av Kabat-nummereringssystemet kan den faktiske lineære aminosyresekvensen inneholde færre eller ytterligere aminosyrer tilsvarende en forkortelse av, eller insersjon i, en FR eller CDR i det variable domenet. De cysteinkonstruerte stedsvariantene i den tunge kjeden er identifisert ved sekvensnummererings- og

5 Kabat-nummereringssystemer.

I en utførelsesform fremstilles cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff ved en fremgangsmåte omfattende:

10 a) utbytting av én eller flere aminosyreenheter av et anti-CD79b-morantistoff med cystein, og

b) bestemmelse av det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffets tiolreaktivitet ved omsetning av det cysteinkonstruerte antistoffet med et tiolreaktivt reagens.

15 Det cysteinkonstruerte antistoffet kan være mer reaktivt enn morantistoffet med det tiolreaktive reagenset.

De frie cysteinaminosyreenhetene kan være lokalisert i de tunge eller lette kjedene, eller i de konstante eller variable domenenene. Antistofffragmenter, f.eks.

20 Fab, kan også være konstruert med én eller flere cysteinaminosyrer som utbytter aminosyrer av antistofffragmentet for å danne cysteinkonstruerte antistofffragmenter.

25 Også beskrevet heri er en fremgangsmåte for fremstilling av et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff, omfattende:

a) tilførsel av én eller flere cysteinaminosyrer til et anti-CD79b-morantistoff for å danne det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet, og

b) bestemmelse av det cysteinkonstruerte antistoffets tiolreaktivitet med et tiolreaktivt reagens,

30 hvor det cysteinkonstruerte antistoffet er mer reaktivt enn morantistoff med det tiolreaktive reagenset.

Trinn (a) i fremgangsmåten for fremstilling av et cysteinkonstruert antistoff kan omfatte:

- i) mutagenisering av en nukleinsyresekvens som koder for cysteinkonstruert antistoff,
- 5 ii) ekspresjon av det cysteinkonstruerte antistoffet, og
- iii) isolering og rensing av det cysteinkonstruerte antistoffet.

Trinn (b) i fremgangsmåten for fremstilling av et cysteinkonstruert antistoff kan omfatte ekspresjon av det cysteinkonstruerte antistoffet på en viral partikkel
10 valgt fra en fag- eller fagemidpartikkel.

Trinn (b) i fremgangsmåten for fremstilling av et cysteinkonstruert antistoff kan også omfatte:

- i) omsetning av det cysteinkonstruerte antistoffet med et tiolreaktivt
15 affinitetsreagens for å danne et affinitetsmerket, cysteinkonstruert antistoff, og
- ii) måling av bindingen av det affinitetsmerkede, cysteinkonstruerte antistoffet til et innfangingsmedium.

20

Også beskrevet heri er en fremgangsmåte for screening av cysteinkonstruerte antistoffer med svært reaktive, uparede cysteinaminosyrer for tiolreaktivitet omfattende:

- a) tilførsel av én eller flere cysteinaminosyrer til et morantistoff for å danne
25 et cysteinkonstruert antistoff,
- b) omsetning av det cysteinkonstruerte antistoffet med et tiolreaktivt affinitetsreagens for å danne et affinitetsmerket, cysteinkonstruert antistoff, og

c) måling av bindingen av det affinitetsmerkede, cysteinkonstruerte antistoffet til et innfangingsmedium, og

d) bestemmelse av det cysteinkonstruerte antistoffets tiolreaktivitet med et tiolreaktivt reagens.

5

Trinn (a) i fremgangsmåten for screening av cysteinkonstruerte antistoffer kan omfatte:

i) mutagenisering av en nukleinsyresekvens som koder for cysteinkonstruert antistoff,

10

ii) ekspresjon av det cysteinkonstruerte antistoffet, og

iii) isolering og rensing av det cysteinkonstruerte antistoffet.

Trinn (b) i fremgangsmåten for screening av cysteinkonstruerte antistoffer kan omfatte ekspresjon av det cysteinkonstruerte antistoffet på en viral partikkel valgt fra en fag- eller fagemidpartikkel.

15

Trinn (b) i fremgangsmåten for screening av cysteinkonstruerte antistoffer kan også omfatte:

i) omsetning av det cysteinkonstruerte antistoffet med et tiolreaktivt affinitetsreagens for å danne et affinitetsmerket, cysteinkonstruert antistoff, og

20

ii) måling av bindingen av det affinitetsmerkede, cysteinkonstruerte antistoffet til et innfangingsmedium.

25

b. Cysteinkonstruksjon av anti-CD79b-IgG-varianter

Cysteine ble tilført i den tunge kjedens posisjon 118 (EU-nummerering) (tilsvarende den tunge kjedens posisjon 118, sekvensnummerering) til de

kimære monoklonale anti-CD79b-morantistoffene av full lengde eller i den lette kjedens posisjon 205 (Kabat-nummerering) (tilsvarende den lette kjedens posisjon 209, sekvensnummerering) til de kimære monoklonale anti-CD79b-morantistoffene av full lengde ved cysteinkonstruksjonsmetodene beskrevet heri.

5

Dannede cysteinkonstruerte antistoffer med cystein ved tung kjede 118 (EU-nummerering) var: a) tio-MA79b.v17-HC(A118C) med sekvens i tung kjede (SEQ ID NO: 228) og sekvens i lett kjede (SEQ ID NO: 229), figur 24, b) tio-MA79b.v18-HC(A118C) med sekvens i tung kjede (SEQ ID NO: 230) og sekvens i lett kjede (SEQ ID NO: 231), figur 25, c) tio-MA79b.v28-HC(A118C), med sekvens i tung kjede (SEQ ID NO: 232) og sekvens i lett kjede (SEQ ID NO: 233), figur 26, d) tio-MA79b-HC(A118C) med sekvens i tung kjede (SEQ ID NO: 236) og sekvens i lett kjede (SEQ ID NO: 237), figur 28, og e) tio-anti-cynoCD79b-HC(A118C) med sekvens i tung kjede (SEQ ID NO: 244) og sekvens i lett kjede (SEQ ID NO: 245), figur 48.

15

Dannede cysteinkonstruerte antistoffer med cystein ved lett kjede 205 (Kabat-nummerering) var: a) tio-MA79b-LC(V205C) med sekvens i tung kjede (SEQ ID NO: 234) og sekvens i lett kjede (SEQ ID NO: 235), figur 27 og (b) tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C) med sekvens i tung kjede (SEQ ID NO: 299) og sekvens i lett kjede (SEQ ID NO: 300), figur 49.

20

Disse cysteinkonstruerte monoklonale antistoffene ble uttrykt i CHO-celler (Chinese Hamster Ovary) ved transient gjæring i medium inneholdende 1 mM-cystein.

25

Ifølge en utførelsesform omfatter humaniserte MA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer én eller flere av følgende sekvenser i tung kjede med en fri cysteinaminosyre (SEQ ID NO: 251–259, tabell 2).

30

Tabell 2: Sammenligning av den tunge kjedens sekvens-, Kabat- og EU-nummerering for humaniserte MA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffvarianter

SEKvens	SEKvens- NUMMERERING	KABAT- NUMMERERING	EU- NUMMERERING	SEQ ID NO:
EVQL <u>Q</u> ESGGG	V5C	V5C		251
LRLSC <u>C</u> ASGYT	A23C	A23C		252
MNSLR <u>C</u> EDTAV	A88C	A84C		253
TLVTV <u>C</u> SASTK	S116C	S112C		254
VTVSS <u>C</u> STKGP	A118C	A114C	A118C	255
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T120C	T116C	T120C	256
WYVDG <u>C</u> EVHNA	V282C	V278C	V282C	257
KGFYP <u>C</u> DIAVE	S375C	S371C	S375C	258
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S400C	S396C	S400C	259

Ifølge en utførelsesform omfatter kimære MA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer én eller flere av følgende sekvenser i lett kjede med en fri cysteinaminosyre (SEQ ID NO: 260–268, tabell 3).

5

Tabell 3: Sammenligning av den tunge kjedens sekvens-, Kabat- og EU-nummerering for chMA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffvarianter:

SEKvens	SEKvens- NUMMERERING	KABAT- NUMMERERING	EU- NUMMERERING	SEQ ID NO:
EVQL <u>Q</u> SGAE	Q5C	Q5C		260
VKIS <u>C</u> CATGYT	K23C	K23C		261
LSSLT <u>C</u> EDSAV	S88C	S84C		262
TSVTV <u>C</u> SASTK	S116C	S112C		263
VTVSS <u>C</u> STKGP	A118C	A114C	A118C	264
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T120C	T116C	T120C	265
WYVDG <u>C</u> EVHNA	V282C	V278C	V282C	266
KGFYP <u>C</u> DIAVE	S375C	S371C	S375C	267

SEKvens	SEKvens- NUMMERERING	KABAT- NUMMERERING	EU- NUMMERERING	SEQ ID NO:
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S400C	S396C	S400C	268

Ifølge en utførelsesform omfatter anti-cynoCD79b(ch10D10)-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer én eller flere av følgende sekvenser i tung kjede med en fri cysteinaminosyre (SEQ ID NO: 269–277, tabell 4).

5

Tabell 4; Sammenligning av den tunge kjedens sekvens-, Kabat- og EU-nummerering for anti-cynoCD79b(ch10D10)-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffvarianter:

SEKvens	SEKvens- NUMMERERING	KABAT- NUMMERERING	EU- NUMMERERING	SEQ ID NO:
EVQL <u>C</u> ESGPG	Q5C	Q5C		269
LSLT <u>C</u> VTGYS	T23C	T23C		270
LNSVT <u>C</u> EDTAT	S88C	S84C		271
TTLTV <u>C</u> SASTK	S111C	S112C		272
LTVSS <u>C</u> STKGP	A113C	A114C	A118C	273
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T115C	T116C	T120C	274
WYVDG <u>C</u> EVHNA	V282C	V278C	V282C	275
KGFYP <u>C</u> DIAVE	S370C	S371C	S375C	276
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S395C	S396C	S400C	277

10 Ifølge en utførelsesform omfatter humaniserte MA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer én eller flere av følgende sekvenser i lett kjede med en fri cysteinaminosyre (SEQ ID NO: 278–284, tabell 5).

15 Tabell 5: Sammenligning av den lette kjedens sekvens- og Kabat-nummerering for humaniserte MA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffvarianter

SEKvens	SEKvens- NUMMERERING	KABAT- NUMMERERING	SEQ ID NO:
SLSAS <u>C</u> GDRVT	V15C	V15C	278
EIKRT <u>C</u> AAPSV	V114C	V110C	279
TVAAP <u>C</u> VFIFP	S118C	S114C	280
FIFPP <u>C</u> DEQLK	S125C	S121C	281
DEQLK <u>C</u> GTASV	S131C	S127C	282
VTEQD <u>C</u> KDSTY	S172C	S168C	283
GLSSP <u>C</u> TKSFN	V209C	V205C	284

Ifølge en utførelsesform omfatter kimære MA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer én eller flere av følgende sekvenser i lett kjede med en fri cysteinaminosyre (SEQ ID NO: 285–291, tabell 6).

- 5 Tabell 6: Sammenligning av den lette kjedens sekvens- og Kabat-nummerering for kimære MA79b-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffvarianter

SEKvens	SEKvens- NUMMERERING	KABAT- NUMMERERING	SEQ ID NO:
SLAVS <u>C</u> GQRAT	L15C	L15C	285
ELKRT <u>C</u> AAPSV	V114C	V110C	286
TVAAP <u>C</u> VFIFP	S118C	S114C	287
FIFPP <u>C</u> DEQLK	S125C	S121C	288
DEQLK <u>C</u> GTASV	S131C	S127C	289
VTEQD <u>C</u> KDSTY	S172C	S168C	290
GLSSP <u>C</u> TKSFN	V209C	V205C	291

- 10 Ifølge en utførelsesform omfatter anti-cynoCD79b(ch10D10)-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer én eller flere av følgende sekvenser i lett kjede med en fri cysteinaminosyre (SEQ ID NO: 292–298, tabell 7).

Tabell 7: Sammenligning av den lette kjedens sekvens- og Kabat-nummerering for anti-cynoCD79b(ch10D10)-cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffvarianter

SEKVENSS	SEKVENSS- NUMMERERING	KABAT- NUMMERERING	SEQ ID NO:
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	292
EIKRTC_AAPSV	V114C	V110C	293
TVAAPC_VFIFP	S118C	S114C	294
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	295
DEQLKC_GTASV	S131C	S127C	296
VTEQDC_KDSTY	S172C	S168C	297
GLSSPC_TKSFN	V209C	V205C	298

c. Merkede cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer

Cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer kan være stedsspesifikt og
 5 virkningsfullt koblet med et tiolreaktivt reagens. Det tiolreaktive reagenset kan
 være et multifunksjonelt linkerreagens, et innfangings-, dvs. affinitetsmerket,
 reagens (f.eks. et biotinlinkerreagens), en påvisningsmarkør (f.eks. et
 fluorforreagens), et immobiliseringsreagens i fast fase (f.eks. SEPHAROSE™,
 polystyren eller glass), eller et legemiddellinkermellomprodukt. Et eksempel på
 10 et tiolreaktivt reagens er N-etylmaleimid (NEM). I et eksempel på en
 utførelsesform stiller omsetning av et tioFab med et biotinlinkerreagens til
 rådighet et biotinyllert tioFab hvorved den konstruerte cysteinenhetens forekomst
 og reaktivitet kan påvises og måles. Omsetning av et tioFab med et
 multifunksjonelt linkerreagens stiller til rådighet et tioFab med en funksjonalisert
 15 linker som kan omsettes videre med et legemiddelenhetreagens eller en annen
 markør. Omsetning av et tioFab med et legemiddellinkermellomprodukt stiller til
 rådighet et tioFab-legemiddelkonjugat.

20 Eksemplene på fremgangsmåter beskrevet her kan alminneligvis anvendes til
 identifikasjon og produksjon av antistoffer, og mer alminneligvis, til andre
 proteiner gjennom anvendelse av konstruksjons- og screeningstrinnene
 beskrevet heri.

En slik metode kan anvendes til konjugering av andre tiolreaktive reagenser hvor den reaktive gruppen for eksempel er et maleimid, et jodacetamid, et pyridyldisulfid eller en annen tiolreaktiv konjugeringspartner (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. i Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, s. 40–55, 643–671). Det tiolreaktive reagenset kan være en legemiddelenhet, en fluorfor slik som et fluorescerende fargestoff som fluorescein eller rhodamin, et chelaterende stoff for et bildediagnostisk eller radioterapeutisk metall, en peptidyl- eller ikke-peptidylmarkør eller påvisningsmarkør, eller et clearancemodifiserende stoff slik som forskjellige isomerer av polyetylenglykol, et peptid som binder til en tredje komponent, eller et annet karbohydrat eller lipofilt stoff.

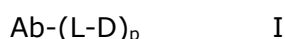
15 **d. Anvendelser av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer**

Cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer, og konjugater derav, kan finne anvendelse som terapeutiske og/eller diagnostiske stoffer. Den foreliggende søknaden beskriver fremgangsmåter for forebygging, håndtering, behandling eller forbedring av én eller flere symptomer assosiert med en B-cellerelatert forstyrrelse. Den foreliggende søknaden beskriver særlig fremgangsmåter for forebygging, håndtering, behandling eller forbedring av én eller flere symptomer assosiert med en celleproliferativ forstyrrelse, slik som kreft, f.eks. lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom. Den foreliggende søknaden beskriver enda videre fremgangsmåter for diagnostisering av en CD79b-relatert forstyrrelse eller predisposisjon for å utvikle en slik forstyrrelse samt fremgangsmåter for identifikasjon av antistoffer, og antigenbindingsfragmenter av antistoffer, som fortrinnsvis binder B-celleassosierte CD79b-polypeptider.

Også beskrevet heri er anvendelsen av et cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff for fremstilling av et legemiddel som er nyttig for behandling av en tilstand som er responsiv overfor en B-cellerelatert forstyrrelse.

e. Cysteinkonstruerte antistofflegemiddelkonjugater (tio-antistofflegemiddelkonjugater (TDC-er))

Også beskrevet heri er en antistofflegemiddelkonjugatforbindelse omfattende et
 5 cysteinkonstruert anti-CD79b-antistoff (Ab), og en auristatinlegemiddelenhet (D) hvor det cysteinkonstruerte antistoffet er bundet gjennom én eller flere frie cysteinaminosyrer av en linkerenheter (L) til D; forbindelsen med formel I:



10

hvor p er 1, 2, 3, eller 4, og hvor det cysteinkonstruerte antistoffet er fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende utbytting av én eller flere aminosyreenheter av et anti-CD79b-morantistoff av én eller flere frie cysteinaminosyrer.

15 Også beskrevet heri er en sammensetning omfattende en blanding av antistofflegemiddelforbindelser med formel I hvor den gjennomsnittlige legemiddelmengden per antistoff er ca. 2 til ca. 5, eller ca. 3 til ca. 4.

Figur 24–28 og 48–49 viser utførelsesformer for cysteinkonstruerte anti-CD79b-
 20 antistofflegemiddelkonjugater (ADC) hvor en auristatinlegemiddelenhet er bundet til en konstruert cysteingruppe i: den lette kjeden (LC-ADC) eller den tunge kjeden (HC-ADC).

Potensielle fordeler ved cysteinkonstruerte anti-CD79b-
 25 antistofflegemiddelkonjugater omfatter forbedret sikkerhet (større terapeutisk indeks), forbedrede PK-parametere, idet antistoffets interkjededisulfidebindinger beholdes og kan stabilisere konjugatet og beholde sin aktive bindingskonformasjon, stedene for legemiddelkonjugering er definert, og fremstillingen av cysteinkonstruerte antistofflegemiddelkonjugater fra
 30 konjugering av cysteinkonstruerte antistoffer til legemiddellinkerreagenser resulterer i et mer homogent produkt.

Linkere

Med "linker" eller "linkerenhet" menes en kjemisk enhet omfattende en kovalent binding eller en kjede av atomer som kovalent binder et antistoff til en legemiddelenhet. I forskjellige utførelsesformer er en linker spesifisert som L. En "linker" (L) er en bifunksjonell eller multifunksjonell enhet som kan anvendes for

5 å binde én eller flere legemiddelenheter (D) og en antistoffenhet (Ab) for å danne antistofflegemiddelkonjugater (ADC) med formel I. Antistofflegemiddelkonjugater (ADC) kan enkelt fremstilles ved hjelp av en linker med reaktiv funksjonalitet for binding til legemiddelet og til antistoffet. Et cysteintiol av et cysteinkonstruert antistoff (Ab) kan danne en binding med en

10 elektrofil funksjonell gruppe av et linkerreagens, en legemiddelenhet eller et legemiddellinkermellomprodukt.

I et aspekt har en linker et reaktivt sted som har en elektrofil gruppe som er reaktiv overfor et nukleofilt cystein på et antistoff. Antistoffets cysteintiol er

15 reaktivt med en elektrofil gruppe på en linker og danner en kovalent binding til en linker. Nyttige elektrofile grupper omfatter blant annet maleimid- og haloacetamidgrupper.

Linkere omfatter en divalent gruppe slik som et alkyldiyl, et arylen, et

20 heteroarylen, enheter slik som: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, gjentakende enheter av alkyloksy (f.eks. polyetylenoksy, PEG, polymetylenoksy) og alkylamino (f.eks. polyetylenamino, Jeffamine™), og diacidester og amider omfattende sukkinat, sukkinamid, diglykolat, malonat og kaproamid.

Cysteinkonstruerte antistoffer reagerer med linkerreagenser eller legemiddellinkermellomprodukter, med elektrofile funksjonelle grupper slik som maleimid eller α -halokarbonyl, ifølge konjugeringsmetoden på side 766 i Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765–773, og ifølge

25 protokollen i eksempel 6.

30

Linkeren kan være sammensatt av én eller flere linkerkomponenter. Eksempler på linkerkomponenter omfatter 6-maleimidokaproyl ("MC"), maleimidopropanoyl ("MP"), valin-citrullin ("val-cit" eller "vc"), alanin-fenylalanin ("ala-phe" eller "af"), p-aminobenzylloksykarbonyl ("PAB"), N-sukkinimidyl-4-(2-pyridyltio)

35 pentanoat ("SPP"), N-sukkinimidyl-4-(N-maleimidometyl) sykloheksan-1-karboksylat ("SMCC"), N-sukkinimidyl-(4-jod-acetyl)aminobenzoat ("SIAB"),

etylenoksy-CH₂CH₂O- som én eller flere gjentakende enheter ("EO" eller "PEO"). Ytterligere linkerkomponenter er kjent i teknikken, og noen er beskrevet heri.

I en utførelsesform har linker L av et ADC formelen:

5



hvor:

10

-A- er en stretcherenhet kovalent bundet til et cysteintiol av antistoffet (Ab),

a er 0 eller 1,

-W- i hvert tilfelle uavhengig er en aminosyreenhet,

w uavhengig er et heltall fra 0 til 12,

-Y- er en spacerenhet kovalent bundet til legemiddelenheten, og

15

y er 0, 1 eller 2.

Stretcherenhet

20

Stretcherenheten (-A-) kan, når den er til stede, binde en antistoffenhet til en aminosyreenhet (-W-). I denne sammenheng har et antistoff (Ab) en funksjonell gruppe som kan danne en binding med en funksjonell gruppe av en stretcher. Nyttige funksjonelle grupper som kan være til stede på et antistoff, enten naturlig eller via kjemisk manipulering, omfatter blant annet sulfhydryl (-SH), amino, hydroksyl, karboksy, den anomeriske hydroksylgruppen av et karbohydrat og karboksyl. I et aspekt er antistoffets funksjonelle grupper sulfhydryl eller amino. Sulfhydrylgrupper kan dannes ved reduksjon av en intramolekylær disulfidbinding av et antistoff. Sulfhydrylgrupper kan eventuelt dannes ved omsetning av en aminogruppe av en lysinenhet av et antistoff ved hjelp av 2-iminotiolan (Trauts reagens) eller et annet sulfhydryldannende

25

reagens. I en utførelsesform har et antistoff (Ab) en fri cysteintiolgruppe som kan danne en binding med en elektrofil funksjonell gruppe av en stretcherenhet. Eksempler på stretcherenheter i konjugater med formel I er beskrevet med formel II og III, hvor Ab-, -W-, -Y-, -D, w og y er som definert ovenfor, og R¹⁷ er

5 en divalent gruppe valgt fra (CH₂)_r C₃-C₈-karbosykl, O-(CH₂)_r-arylen, (CH₂)_r-arylen, -arylen-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(C₃-C₈-karbosykl), (C₃-C₈-karbosykl)-(CH₂)_r, C₃-C₈-heterosykl, (CH₂)_r-(C₃-C₈-heterosykl), -(C₃-C₈-heterosykl)-(CH₂)_r-, -

(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -

(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -

10 (CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂- og -

(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, hvor R^b er H, C₁-C₆-alkyl, -fenyl eller -benzyl, og r uavhengig er et heltall fra 1-10.

Arylen omfatter divalente aromatiske hydrokarbongrupper med 6-20

15 karbonatomer avledet ved fjerning av to hydrogenatomer fra det aromatiske ringsystemet. Typiske arylengrupper omfatter blant annet grupper avledet av benzen, substituert benzen, naftalen, antracen, bifenyl og lignende.

Heterosyklgrupper omfatter et ringsystem hvor én eller flere ringatomer er et

20 heteroatom, f.eks. nitrogen, oksygen og svovel. Heteroringgruppen omfatter 1 til 20 karbonatomer og 1 til 3 heteroatomer valgt fra N, O, P og S. En heteroring kan være en monoring med 3 til 7 ringmedlemmer (2 til 6 karbonatomer og 1 til 3 heteroatomer valgt fra N, O, P og S) eller en biring med 7 til 10 ringmedlemmer (4 til 9 karbonatomer og 1 til 3 heteroatomer valgt fra N, O, P

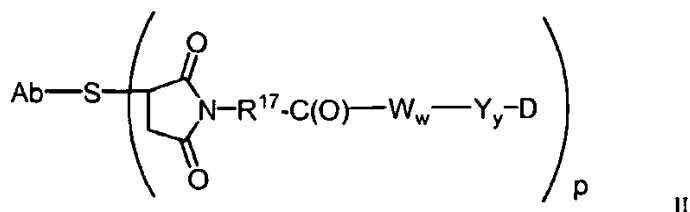
25 og S), f.eks.: et bisyklo[4,5]-, [5,5]-, [5,6]- eller [6,6]-system. Heteroringer er beskrevet i Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), særlig kapittel 1, 3, 4, 6, 7 og 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), særlig volum 13, 14, 16, 19 og 28; og J. Am.

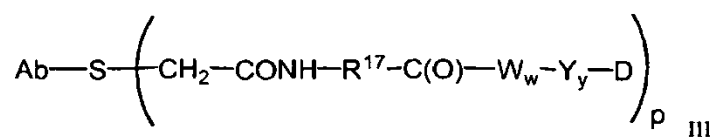
30 Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Eksempler på heteroringer omfatter som eksempel og ikke begrensning pyridyl, dihydroypyridyl, tetrahydropyridyl(pipeidyl), tiazolyl, tetrahydrotiofenyl, svoveloksidert tetrahydrotiofenyl, pyrimidinyl, furanyl, tienyl, pyrrol, pyrazolyl,

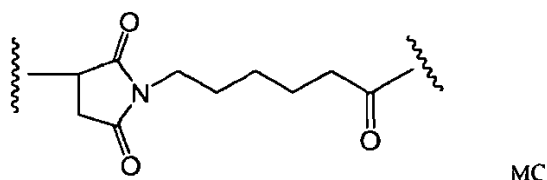
35 imidazolyl, tetrazolyl, benzofuranyl, tianaftalenyl, indolyl, indolenyl, quinolinyl, isoquinolinyl, benzimidazolyl, piperidinyl, 4-piperidonyl, pyrrolidinyl, 2-

- pyrrolidonyl, pyrrolinyl, tetrahydrofuranyl, bis-tetrahydrofuranyl, tetrahydropyranyl, bis-tetrahydropyranyl, tetrahydroquinolinyl, tetrahydroisoquinolinyl, dekahydroquinolinyl, oktahydroisoquinolinyl, azocinyl, triazinyl, 6H-1,2,5-tiadiazinyl, 2H,6H-1,5,2-ditiazinyl, tienyl, tiantrenyl, pyranyl,
- 5 isobenzofuranyl, kromenyl, xantenyl, fenoksatiny, 2H-pyrrolyl, isotiazolyl, isoksazolyl, pyrazinyl, pyridazinyl, indoliziny, isoindolyl, 3H-indolyl, 1H-indazolyl, purinyl, 4H-quinoliziny, ftalazinyl, naftyridinyl, quinoksalinyl, quinazoliny, cinnoliny, pteridinyl, 4Ah-karbazolyl, karbazolyl, β -karbolinyl, fenantridinyl, akridinyl, pyrimidinyl, fenantrolinyl, fenazinyl, fenotiazinyl, furazanyl,
- 10 fenoksazinyl, isokromanyl, kromanyl, imidazolidinyl, imidazoliny, pyrazolidinyl, pyrazoliny, piperazinyl, indoliny, isoindoliny, quinuklidinyl, morfoliny, oksazolidinyl, benzotriazolyl, benzisoksazolyl, oksindolyl, benzoksazoliny og isatinoyl.
- 15 Karbosyklgrupper omfatter en mettett eller umettett ring med 3 til 7 karbonatomer som en monoring eller 7 til 12 karbonatomer som en biring. Monosykliske karbonringer har 3 til 6 ringatomer, enda mer typisk 5 eller 6 ringatomer. Bisykliske karbonringer har 7 til 12 ringatomer, f.eks. ordnet som et bisyklo[4,5]-, [5,5]-, [5,6]- eller [6,6]-system, eller 9 eller 10 ringatomer ordnet
- 20 som et bisyklo[5,6]- eller [6,6]-system. Eksempler på monosykliske karbonringer omfatter syklopropyl, syklobutyl, syklopentyl, 1-syklopent-1-enyl, 1-syklopent-2-enyl, 1-syklopent-3-enyl, sykloheksyl, 1-sykloheks-1-enyl, 1-sykloheks-2-enyl, 1-sykloheks-3-enyl, sykloheptyl og syklooktyl.
- 25 Det er underforstått på grunnlag av alle eksemplene på utførelsesformer for ADC med formel I slik som II-VI, at fra 1 til 4 legemiddelenheter, også hvis det ikke er uttrykkelig angitt, er bundet til et antistoff ($p = 1-4$), avhengig av antallet konstruerte cysteinenheter.

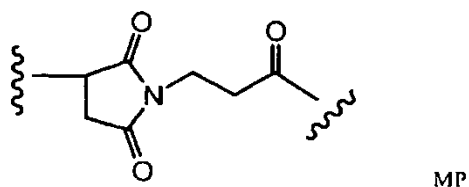




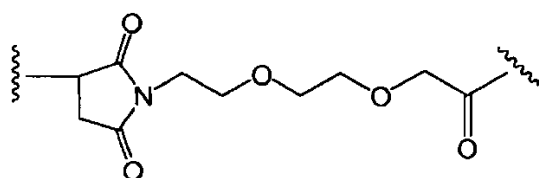
En illustrativ stretcherenhet med formel II er avledet av maleimido-kaproyl (MC) hvor R^{17} er $-(\text{CH}_2)_5-$:



- 5 En illustrativ stretcherenhet med formel II er avledet av maleimido-propanoyl (MP) hvor R^{17} er $-(\text{CH}_2)_2-$:

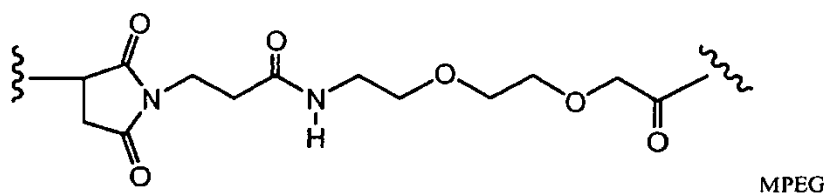


En annen illustrativ stretcherenhet med formel II hvor R^{17} er $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ og r er 2:

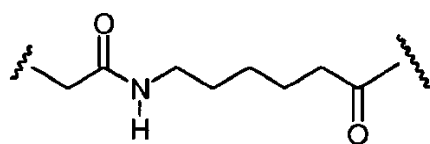


10

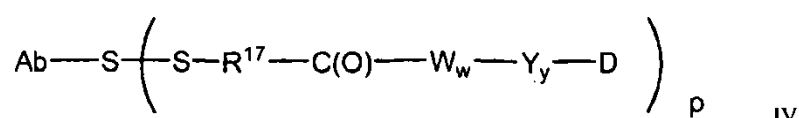
En annen illustrativ stretcherenhet med formel II hvor R^{17} er $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ hvor R^b er H og r i hvert tilfelle er 2:



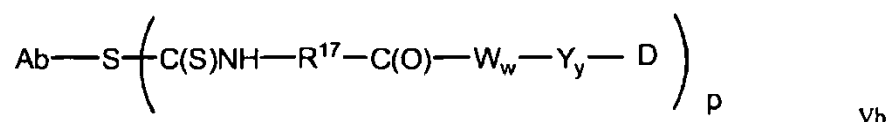
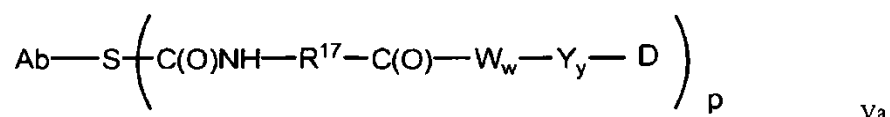
En illustrativ stretcherenhet med formel III hvor R^{17} er $-(\text{CH}_2)_5-$:



- I en annen utførelsesform er stretcherenheten bundet til det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet via en disulfidbinding mellom antistoffets konstruerte cysteinsvovelatom og et svovelatom av stretcherenheten. En representativ stretcherenhet ifølge denne utførelsesformen er beskrevet med formel IV, hvor
- 5 R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w og y er som definert ovenfor.



- I enda en annen utførelsesform inneholder stretcherens reaktive gruppe en tiolreaktiv funksjonell gruppe som kan danne en binding med et fritt cysteintiol
- 10 av et antistoff. Eksempler på tiolreaktive funksjonelle grupper omfatter blant annet maleimid, α -haloacetyl, aktiverte estere slik som sukkinimidestere, 4-nitrofenylestere, pentafluorfenylestere, tetrafluorfenylestere, anhydrider, syreklorider, sulfonylklorider, isocyanater og isotiocyanater. Representative stretcherenheter ifølge denne utførelsesformen er beskrevet med formel Va og
- 15 Vb, hvor $-R^{17}$ -, Ab-, -W-, -Y-, -D, w og y er som definert ovenfor.



- I en annen utførelsesform kan linkeren være en linker av dendrittisk type for
- 20 kovalent binding av mer enn én legemiddelenhet gjennom en forgrenet, multifunksjonell linkerenheter til et antistoff (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). Dendrittiske linkere kan øke molforholdet mellom legemiddel og antistoff,

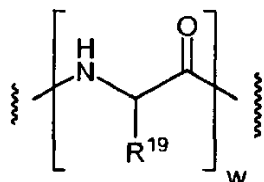
dvs. mengden, som er relatert til ADC-ets potens. Hvis et cysteinkonstruert antistoff bærer bare én reaktiv cysteintiolgruppe, kan en rekke legemiddelenheter således være bundet gjennom en dendrittisk linker.

Aminosyreenhet

5

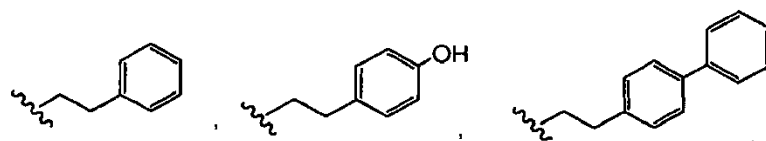
Linkeren kan omfatte aminosyreenheter. Aminosyreenheten(-W_w-) binder, når den er til stede, antistoffet (Ab) til legemiddelenheten (D) av det cysteinkonstruerte antistofflegemiddelkonjugatet (ADC) ifølge oppfinnelsen.

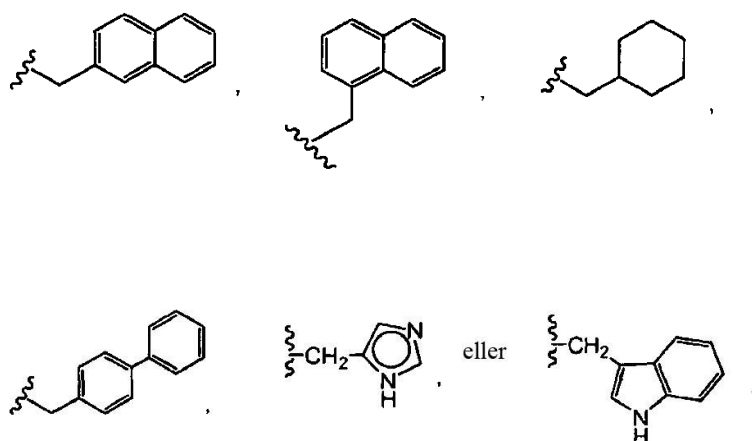
- 10 -W_w- er en dipeptid-, tripeptid-, tetrapeptid-, pentapeptid-, heksapeptid-, heptapeptid-, oktapeptid-, nonapeptid-, dekaeptid-, undekaeptid- eller dodekaeptidenhet. Aminosyreenheter som omfatter aminosyreenheten, omfatter dem som forekommer naturlig, og mindre aminosyrer og ikke naturlig forekommende aminosyreanaloger, slik som citrullin. Hver -W--enhet har
- 15 uavhengig formelen angitt nedenfor i klammeparentes, og w er et heltall fra 0 til 12:



- hvor R¹⁹ er hydrogen, metyl, isopropyl, isobutyl, sek-butyl, benzyl, p-hydroksybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -
- 20 CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, fenyl, sykloheksyl,

25





- Når R^{19} er annet enn hydrogen, er karbonatomet hvortil R^{19} er bundet, kiralt.
 5 Hvert karbonatom hvortil R^{19} er bundet, er uavhengig i (S)- eller (R)-konfigurasjonen, eller en racemisk blanding. Aminosyreenheter kan således være enantiomerisk rene, racemiske eller diastereomeriske.

- Eksempler på $-W_w-$ aminosyreenheter omfatter et dipeptid, et tripeptid, et
 10 tetrapeptid eller et pentapeptid. Eksempler på dipeptider omfatter: valin-citrullin (vc eller val-cit), alanin-fenylalanin (af eller ala-phe). Eksempler på tripeptider omfatter: glycin-valin-citrullin (gly-val-cit) og glycin-glycin-glycin (gly-gly-gly). Aminosyreenheter som omfatter en aminosyrelinkerkomponent, omfatter dem som forekommer naturlig, og mindre aminosyrer og ikke naturlig forekommende
 15 aminosyreanaloger, slik som citrullin.

- Aminosyreenheten kan spaltes enzymatisk av én eller flere enzymer, herunder en tumorassosiert protease, for å frisetten legemiddelenheten (-D), som i en utførelsesform protoneres in vivo ved frisetting for å stille til rådighet et
 20 legemiddel (D). Aminosyrelinkerkomponenter kan konstrueres og optimeres i deres selektivitet for enzymatisk spalting av et særlig enzym, f.eks. en tumorassosiert protease, kathepsin B, C og D, eller en plasminprotease.

Spacerenhet

- 25 Spacerenheten ($-Y_y-$) binder, når den er til stede ($y = 1$ eller 2), en aminosyreenhet ($-W_w-$) til legemiddelenheten (D) når en aminosyreenhet er til stede ($w = 1-12$). Spacerenheten binder eventuelt stretcherenheten til legemiddelenheten når aminosyreenheten er fraværende. Spacerenheten binder

også legemiddelenheten til antistoffenheten når både aminosyreenheten og stretcherenheten er fraværende ($w, y = 0$). Spacerenheter er av to generelle typer: selvimmolative og ikke-selvimmolative. En ikke-selvimmolativ spacerenhet er en hvor deler av eller hele spacerenheten forblir bundet til

5 legemiddelenheten etter spalting, særlig enzymatisk, av en aminosyreenhet fra antistofflegemiddelkonjugatet eller legemiddelenhetlinkeren. Når et ADC inneholdende en glycin-glycin-spacerenhet eller en glycin-spacerenhet gjennomgår enzymatisk spalting via en tumorcelleassosiert protease, en kreftcelleassosiert protease eller en lymfocytassosiert protease, spaltes en

10 glycin-glycin-legemiddelenhet eller en glycin-legemiddelenhet fra Ab-A_a-W_w-. I en utførelsesform finner en uavhengig hydrolyseaksjon sted i målcellene, hvilket spalter glycin-legemiddelenhetsbindingen og frisetter legemiddelet.

I en annen utførelsesform er -Y_y- en p-aminobenzylkarbamoylenhet (PAB) hvis

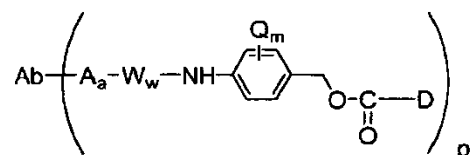
15 fenylen del er substituert med Q_m hvor Q er -C₁-C₈-alkyl, -O-(C₁-C₈-alkyl), -halogen, -nitro eller -cyano, og m er et heltall fra 0 til 4.

Eksempler på utførelsesformer for en ikke-selvimmolativ spacerenhet (-Y-) er: -Gly-Gly-; -Gly-; -Ala-Phe-; -Val-Cit-.

20

I en utførelsesform stilles det til rådighet en legemiddelenhetslinker eller et ADC hvor spacerenheten er fraværende ($y=0$), eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

25 Et ADC inneholdende en selvimmolativ spacerenhet kan eventuelt frisette -D. I en utførelsesform er -Y- en PAB-gruppe som er bundet til -W_w- via PAB-gruppens aminonitrogenatom, og koblet direkte til -D via en karbonat-, karbamat- eller etergruppe, hvor ADC-et har eksempelstrukturen:



30 hvor Q er -C₁-C₈-alkyl, -O-(C₁-C₈-alkyl), -halogen, -nitro eller -cyano, m er et heltall fra 0 til 4 og p er fra 1 til 4.

Andre eksempler på selvimmolative spacere omfatter blant annet aromatiske forbindelser som er elektronisk lik PAB-gruppen slik som 2-aminoimidazol-5-

metanolderivater (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), heterosykliske PAB-analoger (US 2005/0256030), beta-glukuronid (WO 2007/011968), og orto- eller para-aminobenzylacetalder. Det kan benyttes

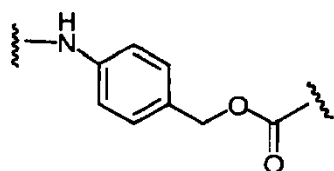
5 spacers som gjennomgår syklisering ved amidbindingshydrolyse, slik som

substituerte og usubstituerte 4-aminosmørsyre-amider (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223), passende substituerte bisyklo[2.2.1]- og bisyklo[2.2.2]-ringsystemer (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) og 2-aminofenylpropionsyre-amider (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Eliminering av aminholdige legemidler som er substituert ved glycin

10 (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447), er også eksempler på

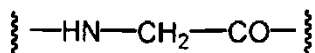
selvimmolativ spacer som er nyttig i ADC-er.

Eksempler på spacerenheter (-Y_y-) er representert ved formel X–XII:

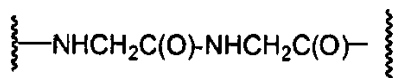


X

15



XI



XII

Dendrittiske linkere

20

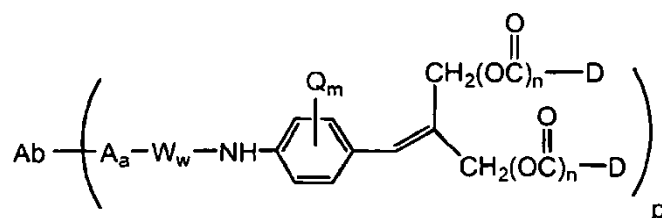
I en annen utførelsesform kan linker L være en linker av dendrittisk type for kovalent binding av mer enn én legemiddelenhet gjennom en forgrenet, multifunksjonell linker enhet til et antistoff (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213–2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761–1768). Dendrittiske linkere kan øke molforholdet

25 mellom legemiddel og antistoff, dvs. mengden, som er relatert til ADC-ets

potens. Hvis et cysteinkonstruert antistoff bærer bare én reaktiv cysteintiolgruppe, kan en rekke legemiddelenheter således være bundet gjennom en dendrittisk linker. Eksempler på utførelsesformer for forgrenede, dendrittiske linkere omfatter 2,6-bis(hydroksymetyl)-p-kresol og 2,4,6-

5 tris(hydroksymetyl)-fenoldendrimerenheter (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).

10 I en utførelsesform er spacerenheten et forgrenet bis(hydroksymetyl)styren (BHMS), som kan anvendes til å inkorporere og frisette flere legemidler, med strukturen:

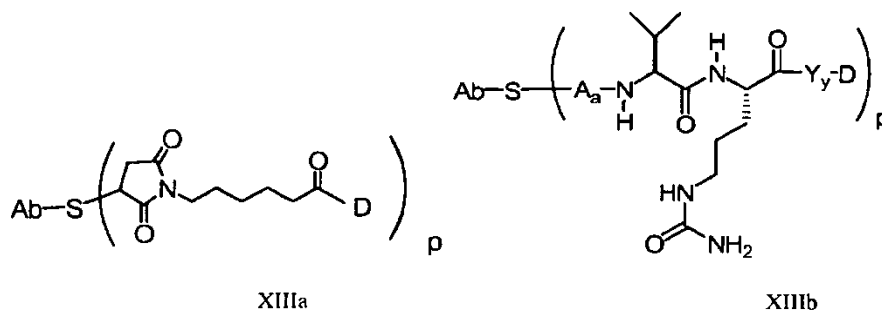


omfattende en 2-(4-aminobenzyliden)propan-1,3-dioldendrimerenhet (WO

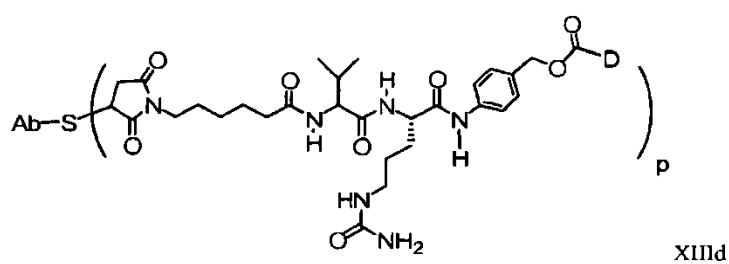
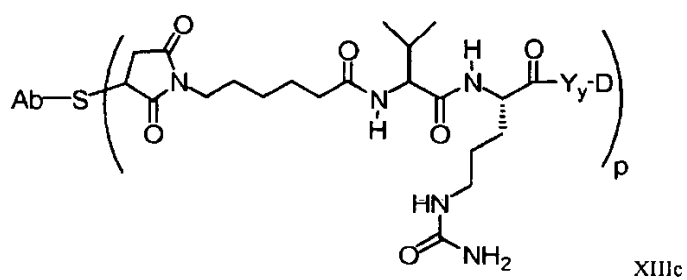
15 2004/043493; de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490–4494), hvor Q er -C₁-C₈-alkyl, -O-(C₁-C₈-alkyl), -halogen, -nitro eller -cyano, m er et heltall fra 0 til 4, n er 0 eller 1 og p er fra 1 til 4.

Eksempler på utførelsesformer for antistofflegemiddelkonjugatforbindelser med

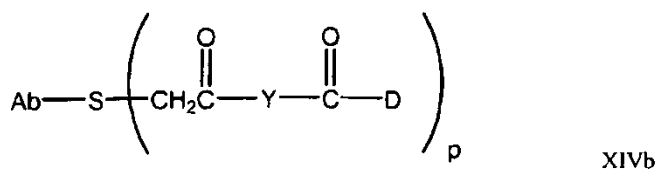
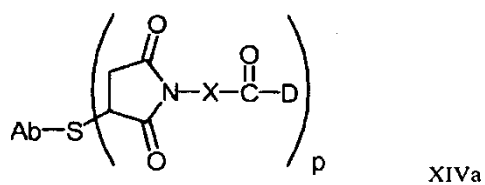
20 formel I omfatter XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit) og XIIId (MC-val-cit-PAB):



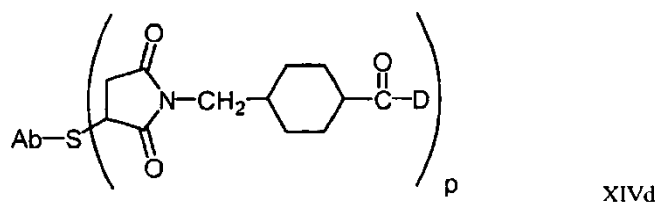
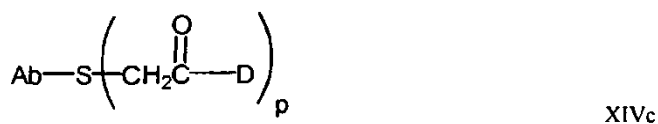
242

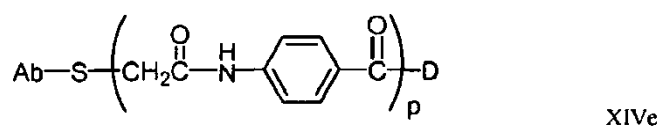


- 5 Andre eksempler på utførelsesformer for antistofflegemiddelkonjugatforbindelser med formel Ia omfatter XIVa-e:

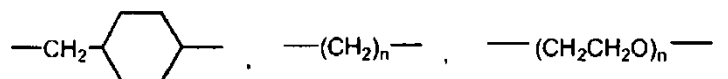


10

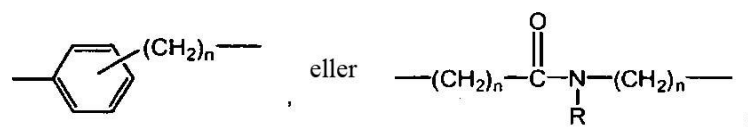
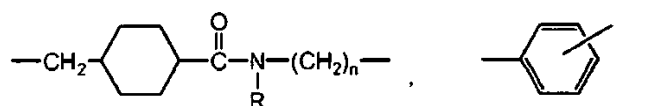




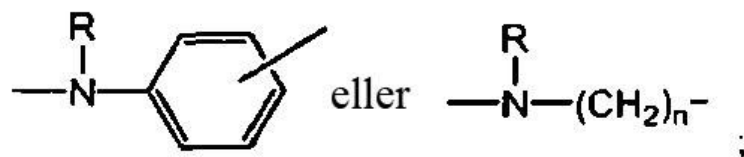
hvor X er:



5



Y er:



10

og R uavhengig er H eller C₁-C₆-alkyl, og n er 1 til 12.

I en annen utførelsesform har en linker en reaktiv funksjonell gruppe som har en nukleofil gruppe som er reaktiv overfor en elektrofil gruppe på et antistoff.

15 Nyttige elektrofile grupper på et antistoff omfatter blant annet aldehyd- og ketonkarbonylgrupper. Heteroatomet av en nukleofil gruppe for en linker kan reagere med en elektrofil gruppe på et antistoff og danne en kovalent binding til en antistoffenhet. Nyttige nukleofile grupper på en linker omfatter blant annet hydrazid, oksim, amino, hydrazin, tiosemikarbazon, hydrazinkarboksylat og

20 arylhydrazid. Den elektrofile gruppen på et antistoff stiller til rådighet et egnet sted for binding til en linker.

Linkere av peptidtypen kan typisk være fremstilt ved dannelsen av en peptidbinding mellom to eller flere aminosyrer og/eller peptidfragmenter. Slike

25 peptidbindinger kan for eksempel være fremstilt ifølge væskefasesyntesemetoden (E. Schröder and K. Lübke (1965) "The Peptides", volume 1, s. 76-136, Academic Press) som er velkjent innenfor peptidkjemi.

Linkermellomprodukter kan sammenstilles med en hvilken som helst kombinasjon eller sekvens av reaksjoner omfattende spacer-, stretcher- og aminosyreenheter. Spacer-, stretcher- og aminosyreenhetene kan anvende reaktive funksjonelle grupper som er elektrofile, nukleofile eller frie grupper av natur. Reaktive funksjonelle grupper omfatter blant annet karboksyler, hydroksyler, para-nitrofenylkarbonat, isotiocyanat og fraspaltelige grupper, slik som O-mesyl, O-tosyl, -Cl, -Br, -I eller maleimid.

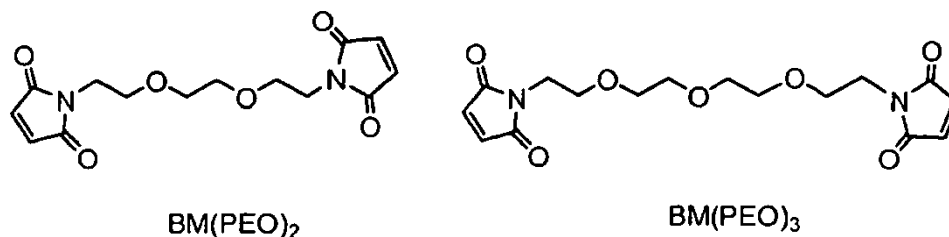
En ladet substituent slik som sulfonat ($-\text{SO}_3^-$) eller ammonium kan for eksempel øke reagensets vannløselighet og lette koblingsreaksjonen mellom linkerreagenset og antistoffet eller legemiddelenheten, eller lette koblingsreaksjonen mellom Ab-L (antistofflinkermellomprodukt) og D, eller D-L (legemiddellinkermellomprodukt) og Ab, avhengig av den syntetiske ruten anvendt til å fremstille ADC.

15 **Linkerreagenser**

Konjugater av antistoffet og auristatin kan fremstilles ved hjelp av en rekke bifunksjonelle linkerreagenser slik som N-sukkinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP), sukkinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladipimidat HCl), aktive estere (slik som disukkinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azido-forbindelser (slik som bis(p-azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som toluen-2,6-diisocyanat) og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen).

Antistofflegemiddelkonjugatene kan også fremstilles med linkerreagenser: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC og sulfo-SMPB, og SVSB (sukkinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat), og omfattende bis-maleimidreagenser: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietylenglykol ($\text{BM}(\text{PEO})_2$), og 1,11-bis-maleimidotrietylenglykol ($\text{BM}(\text{PEO})_3$), som er kommersielt tilgjengelig fra Pierce Biotechnology, Inc.,

- ThermoScientific, Rockford, IL, og andre reagensleverandører. Bis-maleimidreagenser gir mulighet for binding av tiolgruppen av et cysteinkonstruert antistoff til en tiolholdig legemiddelenhet, en markør eller et linkermellomprodukt, på en sekvensiell eller samtidig måte. Andre funksjonelle
- 5 grupper ved siden av maleimid, som er reaktive med en tiolgruppe av et cysteinkonstruert antistoff, en legemiddelenhet, en markør eller et linkermellomprodukt omfatter jodacetamid, bromacetamid, vinylpyridin, disulfid, pyridyldisulfid, isocyanat og isotiocyanat.

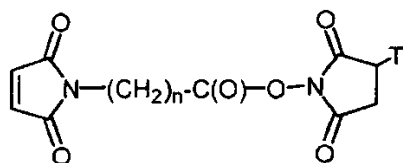


10

Nyttige linkerreagenser kan også oppnås via andre kommersielle kilder, slik som Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), eller syntetiseres i samsvar med prosedyrer beskrevet i 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

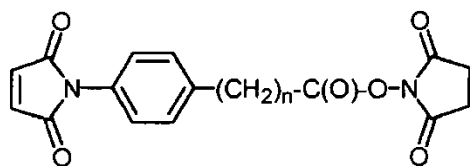
15 Chem. 7:180–186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583 og WO 04/032828.

Stretchere med formel (IIIa) kan tilføres til en linker ved omsetning av følgende linkerreagenser med N-terminalen av en aminosyreenhet:



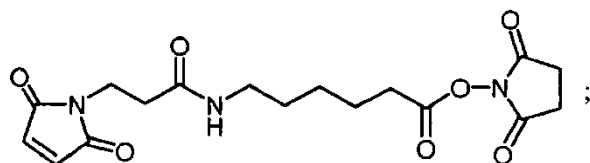
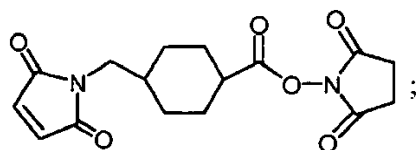
20

hvor n er et heltall fra 1 til 10, og T er -H eller -SO₃Na,

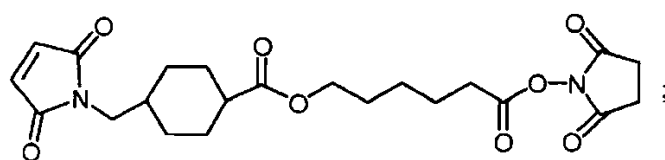


246

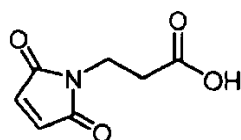
hvor n er et heltall fra 0 til 3,



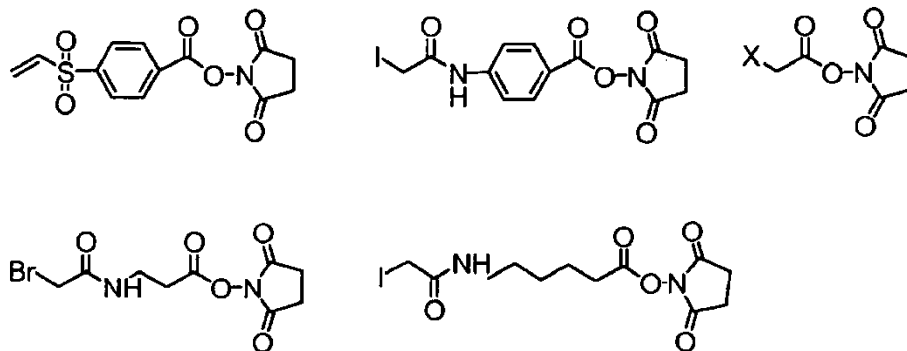
5



og

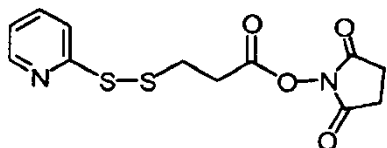


- 10 Stretcherenheter kan tilføres til en linker ved omsetning av følgende bifunksjonelle reagenser med N-terminalen av en aminosyreenhet:

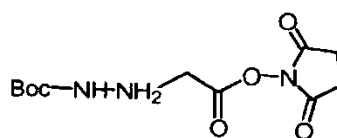
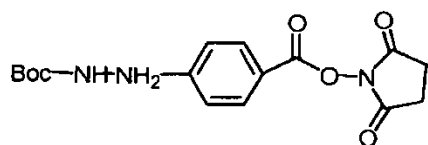
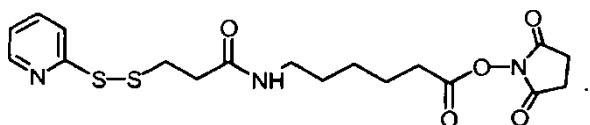


- 15 hvor X er Br eller 1.

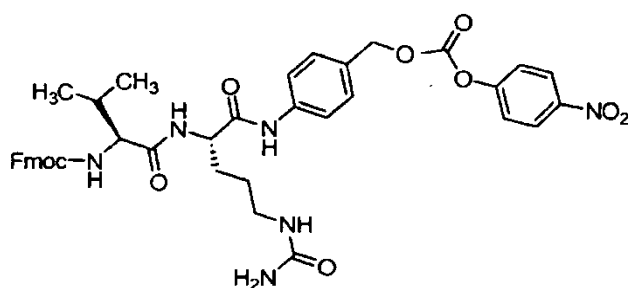
Stretcherenheter med formel kan også tilføres til en linker ved omsetning av følgende bifunksjonelle reagenser med N-terminalen av en aminosyreenhet:



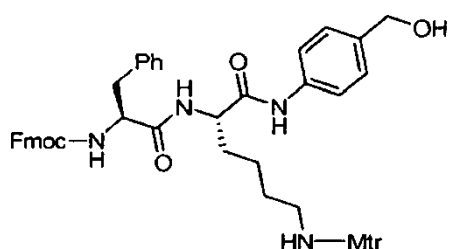
5



Et eksempel på et valin-citrullin-dipeptidlinkerreagens (val-cit eller vc) med en maleimidstretcher og en selvimmolativ para-aminobenzylkarbamoylspacer (PAB) har strukturen:



Et eksempel på et phe-lys(Mtr, mono-4-metoksytrytyl)-dipeptidlinkerreagens med en maleimidstretcherenhet og en selvimmolativ PAB-spacerenhet kan fremstilles ifølge Dubowchik et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, og har strukturen:



Fremstilling av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugater

- 5 ADC med formel I kan fremstilles ved flere ruter ved hjelp av reaksjoner, betingelser og reagenser i den organiske kjemi som er kjent for fagpersoner, herunder: 1) reaksjon mellom en cysteingrouppe av et cysteinkonstruert antistoff og et linkerreagens, for å danne antistofflinkermellomprodukt Ab-L, via en kovalent binding, etterfulgt av reaksjon med en aktivert legemiddelenhet D, og
- 10 2) reaksjon mellom en nukleofil gruppe av en legemiddelenhet og en linkerreagens, for å danne legemiddellinkermellomprodukt D-L, via en kovalent binding, etterfulgt av reaksjon med en cysteingrouppe av et cysteinkonstruert antistoff. Konjugeringsmetode (1) og (2) kan anvendes med en rekke cysteinkonstruerte antistoffer, legemiddelenheter og linkere for å fremstille
- 15 antistofflegemiddelkonjugatene med formel I.

Antistoffcysteintiolgrupper er nukleofile og i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkerreagenser og legemiddellinkermellomprodukter omfattende: i) aktive estere slik som NHS-estere, HOBt-estere, haloformater og syrehalider, ii) alkyl- og benzylhalider, slik

20 som haloacetamider, iii) aldehyder, ketoner, karboksyl og maleimidgrupper og iv) disulfider, herunder pyridyldisulfider, via sulfidbytte. Nukleofile grupper på en legemiddelenhet omfatter blant annet: amin-, tiol-, hydroksyl-, hydrazid-, oksim-, hydrazin-, tiosemikarbazon-, hydrazinkarboksylat- og

25 arylhydrazidgrupper i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkereneheter og linkerreagenser.

Cysteinkonstruerte antistoffer kan fremstilles reaktive for konjugering med linkerreagenser ved behandling med et reduksjonsstoff slik som DTT (Clelands

30 reagens, ditionitritol) eller TCEP (tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid, Getz et al

- (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73–80; Soltec Ventures, Beverly, MA), etterfulgt av reoksidering for å reformere interkjede- og intrakjededisulfidbindinger (eksempel 5). Cysteinkonstruerte monoklonale antistoffer av full lengde (tioMabs) uttrykt i CHO-celler reduseres for eksempel med ca. et 50 gangers
- 5 moloverskudd av TCEP i 3 h ved 37 °C for å redusere disulfidbindinger i cysteinaddukter som kan dannes mellom de nylig tilførte cysteinenhetene og cysteinet i kulturmediet. Det reduserte tioMab fortynnes og lastes på HiTrap S-kolonne i 10 mM natriumacetat, pH 5, og elueres med PBS inneholdende 0,3 M natriumklorid. Disulfidbindinger ble gjenopprettet mellom cysteinenheter i mor-
- 10 Mab med fortynnet (200 nM) vandig kobbersulfat (CuSO_4) ved romtemperatur over natten. Dehydroaskorbinsyre (DHAA) er eventuelt et effektivt oksideringsmiddel for å gjenopprette intrakjededisulfidgruppene av det cysteinkonstruerte antistoffet etter reduktiv spalting av cysteinadduktene. Andre oksideringsmidler og oksideringsbetingelser som er kjent i teknikken, kan
- 15 anvendes. Oksidering i omgivelsesluft er også effektivt. Dette milde, delvise reoksideringstrinnet danner intrakjededisulfider effektivt med høy pålitelighet og bevarer de nylig tilførte cysteinenhetenes tiolgrupper. Et ca. 10 gangers overskudd av legemiddellinkermellomprodukt, f.eks. MC-vc-PAB-MMAE, ble tilsatt og blandet og fikk stå i ca. en time ved romtemperatur for å utføre
- 20 konjugering og danne anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugatet. Konjugeringsblandingen ble gelfiltrert og lastet og eluert gjennom en HiTrap S-kolonne for å fjerne overflødig legemiddellinkermellomprodukt og andre urenheter.
- 25 Figur 23 viser den generelle fremgangsmåten for fremstilling av et cysteinkonstruert antistoff uttrykt fra cellekultur for konjugering. Når cellekulturmediet inneholder cystein, kan disulfidaddukter dannes mellom den nylig tilførte cysteinaminosyren og cysteinet fra mediet. Disse cysteinadduktene, gjengitt som en ring i eksempelet på tioMab (t.v.) på figur 23, må reduseres for
- 30 å danne cysteinkonstruerte antistoffer som er reaktive for konjugering. Cysteinaddukter, formodentlig sammen med diverse interkjededisulfidbindinger, spaltes reduktivt for å gi en redusert form av antistoffet med reduksjonsstoffer slik som TCEP. Interkjededisulfidbindingene mellom parede cysteinenheter reformeres under delvise oksideringsbetingelser med kobbersulfat, DHAA eller
- 35 eksponering for omgivelsesoksygen. De nylig tilførte, konstruerte og uparede cysteinenhetene forblir tilgjengelige for reaksjon med linkerreagenser eller

legemiddellinkermellomprodukter for å danne antistoffkonjugatene ifølge oppfinnelsen. TioMab-ene uttrykt i cellelinjer hos pattedyr resulterer i eksternt konjugert Cys-addukt til en konstruert Cys gjennom -S-S-bindingsdannelse. De rensede tioMab-ene behandles således med reduksjons- og reoksidierungsprosedyrer som beskrevet i eksempel 5 for å produsere reaktive tioMab-er. Disse tioMab-ene anvendes til å konjugere med maleimidholdige cytotoksiske legemidler, fluorforer og andre markører.

10. Immunliposomer

10 Anti-CD79b-antistoffene beskrevet heri kan også være formulert som immunliposomer. Et "liposom" er en liten vesikkel sammensatt av forskjellige typer lipider, fosfolipider og/eller surfaktanter som er nyttige for tilførsel av et legemiddel til et pattedyr. Liposomets komponenter er vanligvis ordnet i en tosjiktsformasjon lik lipidarrangementet av biologiske membraner. Liposomer
15 inneholdende antistoffet fremstilles ved fremgangsmåter som er kjent i teknikken, slik som beskrevet i Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); US-patent nr. 4 485 045 og 4 544 545 og WO97/38731 publisert 23. oktober 1997. Liposomer med forbedret sirkuleringstid er beskrevet i US-patent nr. 5 013 556.

20

Særlig nyttige liposomer kan dannes ved fremgangsmåten for fordamping med omvendt fase med en lipidsammensetning omfattende fosfatidylkolin, kolesterol og PEG-avledende fosfatidyletanolamin (PEG-PE). Liposomer ekstruderes gjennom filtre med definert porestørrelse for å gi liposomer med ønsket
25 diameter. Fab'-fragmenter av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan konjugeres til liposomene som beskrevet i Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286–288 (1982) via en disulfidutvekslingsreaksjon. Et kjemoterapeutisk stoff finnes eventuelt i liposomet. Se Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

30 B. Visse fremgangsmåter for fremstilling av antistoffer

1. Screening for anti-CD79b-antistoffer med ønskede egenskaper

Teknikker for dannelsen av antistoffer som binder til CD79b-polypeptider, er beskrevet ovenfor. Antistoffer med visse biologiske karakteristikkene kan videre velges som ønsket.

5

De vekstinhiberende virkningene av et anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen kan vurderes ved fremgangsmåter kjent i teknikken, f.eks. ved hjelp av celler som uttrykker et CD79b-polypeptid enten endogent eller etter transfeksjon med CD79b-genet. Relevante tumorcellelinjer og CD79b-transfekteerte celler kan for eksempel behandles med et monoklonalt anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen ved forskjellige konsentrasjoner i noen få dager (f.eks. 2–7) dager og farges med krystallfiolett eller MTT eller analyseres ved et annet kolorimetrisk assay. En annen fremgangsmåte for måling av proliferasjon ville være ved sammenligning av cellenes ^3H -tymidinopptak behandlet under nærvær eller fravær av et anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen. Etter behandling høstes cellene, og mengden av radioaktivitet inkorporeres i DNA-et kvantitert i en scintillasjonsteller. Relevante positive kontroller omfatter behandling av en valgt cellelinje med et vekstinhiberende antistoff kjent for å inhibere vekst av denne cellelinjen. Vekstinhibering av tumorceller *in vivo* kan bestemmes på forskjellige måter som er kjent i teknikken. Tumorcellen kan være en som overuttrykker et CD79b-polypeptid. Anti-CD79b-antistoffet vil inhibere celleproliferasjon av en CD79b-uttrykkende tumorcelle *in vitro* eller *in vivo* med ca. 25–100 % sammenlignet med den ubehandlede tumorcellen, mer fortrinnsvis med ca. 30–100 %, og enda mer fortrinnsvis med ca. 50–100 % eller 70–100 %, i en utførelsesform, ved en antistoffkonsentrasjon på ca. 0,5 til 30 µg/ml. Vekstinhibering kan måles ved en antistoffkonsentrasjon på ca. 0,5 til 30 µg/ml eller ca. 0,5 nM til 200 nM i cellekultur, hvor vekstinhiberingen bestemmes 1–10 dager etter eksponering av tumorcellene for antistoffet. Antistoffet er vekstinhiberende *in vivo* hvis tilførsel av anti-CD79b-antistoffet ved ca. 1 µg/kg til ca. 100 mg/kg kroppsvekt resulterer i reduksjon av tumorstørrelse eller reduksjon av tumorcelleproliferasjon innen ca. 5 dager til 3 måneder etter den første tilførsel av antistoffet, fortrinnsvis innen ca. 5 til 30 dager.

For å velge for et anti-CD79b-antistoff som induserer celledød, kan tap av membranintegritet som indikert ved for eksempel propidiumjodid (PI), trypanblå eller 7AAD-opptak vurderes i forhold til kontroll. Et PI-opptaksassay kan utføres

35

under fravær av komplement- og immuneffektorceller. CD79b-polypeptiduttrykkende tumorceller inkuberes bare med medium eller med medium inneholdende det relevante anti-CD79b-antistoffet (f.eks. ved ca. 10 µg/ml). Cellene inkuberes i en 3-dages tidsperiode. Etter hver behandling

5 skylles celler og alikvoteres til 35 mm silkapslede 12 x 75 glass (1 ml per glass, 3 glass per behandlingsgruppe) for fjerning av celleklumper. Glassene får deretter PI (10 µg/ml). Prøvene kan analyseres ved hjelp av et FACSCAN®-strømningscytometer og FACSCONVERT® CellQuest-programvare (Becton Dickinson). De anti-CD79b-antistoffene som induserer statistisk signifikante

10 nivåer av celledød som bestemt ved PI-opptak, kan være valgt som celledøinduserende anti-CD79b-antistoffer.

For å screene for antistoffer som binder til en epitop på et CD79b-polypeptid bundet av et antistoff av interesse, kan det utføres et rutinemessig

15 kryssblokkerende assay slik som det beskrevet i Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Dette assayet kan anvendes til å bestemme om et testantistoff binder samme sted eller epitop som et kjent anti-CD79b-antistoff. Epitopkartlegging kan eventuelt eller i tillegg utføres ved fremgangsmåter som er kjent i teknikken.

20 Antistoffsekvensen kan for eksempel mutageniseres, slik som ved alaninskanning, for å identifisere kontaktenheter. Mutantantistoffet testes innledningsvis for binding med polyklont antistoff for å sikre passende folding. I en annen fremgangsmåte kan peptider tilsvarende forskjellige regioner av et CD79b-polypeptid anvendes i kompetitive assayer med testantistoffene eller med

25 et testantistoff og et antistoff med en karakterisert eller kjent epitop.

2. Visse fremgangsmåter for biblioteksscreening

Anti-CD79b-antistoffer ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved hjelp av kombinasjonsbiblioteker for å screene for antistoffer med ønsket eller ønskede

30 aktiviteter. En rekke fremgangsmåter er for eksempel kjent i teknikken for å danne fagvisningsbiblioteker og screening av slike biblioteker for antistoffer med ønskede bindingskarakteristikker. Slike fremgangsmåter er generelt beskrevet i Hoogenboom et al. (2001) i Methods in Molecular Biology 178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ) og i visse utførelsesformer, i Lee et al.

35 (2004) J. Mol. Biol. 340:1073–1093.

Syntetiske antistoffkloner er valgt ved screeningfagbiblioteker inneholdende fag som viser forskjellige fragmenter av et antistoffs variable region (Fv) fusjonert til fagkappeprotein. Slike fagbiblioteker panoreres ved affinitetskromatografi mot
5 det ønskede antigenet. Kloner som uttrykker Fv-fragmenter som kan binde til det ønskede antigenet, adsorberes til antigenet og separeres således fra de ikke-bindende klonene i biblioteket. Bindingsklonene elueres deretter fra antigenet og kan anrikes ytterligere ved tilleggssykluser med antigenadsorpsjon/-eluering. Et hvilket som helst av anti-CD79b-antistoffene ifølge oppfinnelsen kan oppnås ved
10 utpekelse av en egnet antigenscreeningsprosedyre for å velge for fagklonen av interesse etterfulgt av konstruksjon av en anti-CD79b-antistoffklon av full lengde ved hjelp av Fv-sekvensene fra fagklonen av interesse og egnede sekvenser fra konstant region (Fc) beskrevet i Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD
15 (1991), vols. 1–3.

I visse utførelsesformer dannes antigenbindingsdomenet av et antistoff fra to variable (V) regioner med ca. 110 aminosyrer, i hvert tilfelle et fra den lette (VL) og den tunge (VH) kjeden, som begge viser tre hypervariable sløyfer (HVR-er)
20 eller komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er). Variable domener kan vises funksjonelt på fag, enten som enkjedede Fv-fragmenter (scFv), hvor VH og VL er kovalent bundet gjennom et kort, fleksibelt peptid, eller som Fab-fragmenter, hvor de i hvert tilfelle er fusjonert til et konstant domene og vekselvirker ikke-kovalent, som beskrevet i Winter et al., Ann. Rev. Immunol.,
25 12: 433–455 (1994). Som anvendt heri kalles scFv som koder for fagkloner, og Fab som koder for fagkloner, sammen "Fv-fagkloner" eller "Fv-kloner".

Repertoarer av VH- og VL-gener kan klones separat ved polymerasekjedereaksjon (PCR) og tilfeldig rekombineres i fagbiblioteker, som
30 deretter kan gjennomføres etter antigenbindingskloner som beskrevet i Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433–455 (1994). Biblioteker fra immuniserte kilder gir antistoffer med høy affinitet for immunogenet uten krav om å konstruere hybridomer. Det naive repertoaret kan eventuelt klones for å gi en enkelt kilde til humane antistoffer mot et bredt spekter av ikke-selv- og også
35 selvantigener uten immunisering som beskrevet av Griffiths et al., EMBO J, 12: 725–734 (1993). Naive biblioteker kan også endelig fremstilles syntetisk ved

kloning av urearrangerte V-gensegmenter fra stamceller, og ved hjelp av PCR-primere inneholdende tilfeldig sekvens for å kode for de svært variable CDR3-regionene og for å oppnå rearrangement in vitro som beskrevet av Hoogenboom og Winter, J. Mol. Biol., 227: 381–388 (1992).

5

I visse utførelsesformer anvendes filamentøst fag til å vise antistofffragmenter ved fusjon til det mindre kappeprotein pIII. Antistofffragmentene kan vises som enkjedede Fv-fragmenter, hvor VH- og VL-domener kobles på samme polypeptidkjede av en fleksibel polypeptidspacer, f.eks. som beskrevet av Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581–597 (1991), eller som Fab-fragmenter, hvor den ene kjeden fusjonerer til pIII og den andre utskilles til det bakterielle vertscelleperiplasmet hvor sammenstilling av en Fab-kappeproteinstruktur blir vist på fagoverflaten ved forskyvning av noen av villtype-kappeproteinene, f.eks. som beskrevet i Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133–4137 (1991).

15

Nukleinsyrer som koder for antistoffgenfragmenter, oppnås fra immunceller høstet fra mennesker eller dyr. Hvis det ønskes et bibliotek påvirket til fordel for anti-CD79b-kloner, immuniseres pasienten med CD79b for å danne en antistoffrespons, og miltceller og/eller andre sirkulerende B-celler enn lymfocytter i perifert blod (PBL-er) utvinnes for bibliotekkonstruksjon. I en foretrukket utførelsesform oppnås et humant antistoffgenfragmentbibliotek påvirket til fordel for anti-CD79b-klones ved dannelse av en anti-CD79b-antistoffrespons hos transgene mus som bærer et funksjonelt humant immunglobulingenarray (og uten et funksjonell endogent antistoffproduksjonssystem) slik at CD79b-immunisering gir B-celler som produserer humane antistoffer mot CD79b. Dannelsen av humant antistoffproduserende transgene mus er beskrevet nedenfor.

25

Ytterligere anrikelse for anti-CD79b-reaktive cellepopulasjoner kan oppnås ved hjelp av en egnet screeningprosedyre for å isolere B-celler som uttrykker CD79b-spesifikt membranbundet antistoff, f.eks. ved celleseparasjon ved hjelp av CD79b-affinitetskromatografi eller adsorpsjon av celler til fluorkrommerket CD79b etterfulgt av strømningsaktivert celledatering (FACS).

30

Anvendelse av miltceller og/eller B-celler eller andre PBL-er fra en ikke-immunisert donor stiller eventuelt til rådighet en bedre representasjon av det

35

- mulige antistoffrepertoaret, og gir også mulighet for konstruksjon av et antistoffbibliotek ved hjelp av hvilke som helst dyrearter (humane eller ikke-humane arter) hvor CD79b ikke er antigen. For biblioteker som inkorporerer antistoffgenkonstruksjon in vitro, høstes stamceller fra pasienten for å gi
- 5 nukleinsyrer som koder for ikke-rearrangerte antistoffgensegmenter. Immuncellene av interesse kan oppnås fra en rekke dyrearter, slik som mennesker, mus, rotter, haredyr, ulver, hunder, katter, svin, storfe, hester og fugler osv.
- 10 Nukleinsyre som koder for et antistoffs variable gensegmenter (omfattende VH- og VL-segmenter), utvinnes fra cellene av interesse og amplifiseres. Ved rearrangerte VH- og VL-genbiblioteker kan det ønskede DNA-et oppnås ved isolering av genomisk DNA eller mRNA fra lymfocytter etterfulgt av polymerasekjedereaksjon (PCR) med primere som matcher 5'- og 3'-endene av
- 15 rearrangerte VH- og VL-gener som beskrevet i Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833–3837 (1989), hvorved forskjellige V-genrepertoarer for ekspresjon fremstilles. V-genene kan amplifiseres fra cDNA og genomisk DNA, med bakoverprimere i 5'-enden av eksonet som koder for modent V-domene, og foroverprimere basert i J-segmentet som beskrevet i Orlandi et al. (1989) og i
- 20 Ward et al., Nature, 341: 544–546 (1989). Men for amplifikasjon fra cDNA kan også bakoverprimere være basert i ledereksonet som beskrevet i Jones et al., Biotechnol., 9: 88–89 (1991), og foroverprimere i den konstante regionen som beskrevet i Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728–5732 (1989). For å maksimere komplementaritet kan degenerasjon inkorporeres i primerne
- 25 som beskrevet i Orlandi et al. (1989) eller Sastry et al. (1989). I visse utførelsesformer maksimeres biblioteksmangfoldet ved hjelp av PCR-primere utpekt for hver V-genfamilie for å amplifisere alle tilgjengelige VH- og VL-arrangementer i immuncellenukleidsyreprøven, f.eks. som beskrevet i fremgangsmåten i Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581–597 (1991) eller som
- 30 beskrevet i fremgangsmåten i Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491–4498 (1993). For kloning av det amplifiserte DNA-et til ekspresjonsvektorer kan det tilføres sjeldne restriksjonssteder til PCR-primeren som en markør i den ene enden som beskrevet i Orlandi et al. (1989), eller ved ytterligere PCR-amplifikasjon med en merket primer som beskrevet i Clackson et al., Nature,
- 35 352: 624–628 (1991).

Repertoarer av syntetisk rearrangerte V-gener kan være avledet in vitro av V-gensegmenter. De fleste humane VH-gensegmentene klones og sekvenseres (rapportert i Tomlinson et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 776–798 (1992)) og kartlegges (rapportert i Matsuda et al., *Nature Genet.*, 3: 88–94 (1993); disse klonede segmentene (omfattende alle de større konformasjonene av H1- og H2-sløyfen) kan anvendes til å danne forskjellige VH-genrepertoarer med PCR-primere som koder for H3-sløyfer av forskjellig sekvens og lengde som beskrevet i Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992). VH-repertoarer kan også fremstilles med hele sekvensmangfoldet fokusert i en lang H3-sløyfe av en enkelt lengde som beskrevet i Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457–4461 (1992). Humane Vk- og Vl-segmenter klones og sekvenseres (rapportert i Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456–1461 (1993)) og kan anvendes til å fremstille syntetiske repertoarer i den lette kjeden. Syntetiske V-genrepertoarer, basert på en rekke VH- og VL-folder, og L3- og H3-lengder, vil kode for antistoffer med betydelig strukturelt mangfold. Etter amplifikasjon av V-gen som koder for DNA-er, kan V-gensegmenter i kjønnseller rearrangeres in vitro ifølge fremgangsmåtene i Hoogenboom og Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992).

Repertoarer av antistoffragmenter kan konstrueres ved kombinasjon av VH- og VL-genrepertoarer på flere måter. Hvert repertoar kan dannes i forskjellige vektorer, og vektorene kan rekombineres in vitro, f.eks. som beskrevet i Hogrefe et al., *Gene*, 128: 119–126 (1993), eller in vivo ved kombinasjonsinfeksjon, f.eks. loxP-systemet beskrevet i Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265–2266 (1993). In vivo-rekombinasjonsmetoden utnytter Fab-fragmentenes tokjedersart for å overkomme grensen på bibliotekstørrelse bestemt ved *E. coli*-omdannelseeffektivitet. Naive VH- og VL-repertoarer klones separat, det ene til et fagemid og det andre til en fagvektor. De to bibliotekene kombineres deretter ved faginfeksjon av fagemidholdige bakterier slik at hver celle inneholder en forskjellig kombinasjon og bibliotekstørrelsen bare er begrenset av antallet tilstedeværende celler (ca. 10^{12} kloner). Begge vektorene inneholder in vivo-rekombinasjonssignaler slik at VH- og VL-genene rekombineres på et enkelt replikon og pakkes samtidig til fagvirioner. Disse store bibliotekene stiller til rådighet store antall av forskjellige antistoffer med god affinitet (K_d^{-1} på ca. 10^8 M).

Repertoarene kan eventuelt klones sekvensielt inn i samme vektor, f.eks. som beskrevet i Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978–7982 (1991), eller settes sammen av PCR og deretter klones, f.eks. som beskrevet i Clackson et al., *Nature*, 352: 624–628 (1991). PCR-sammenstilling kan også anvendes til

5 å sammenkoble VH og VL DNA-er med DNA som koder for en fleksibel peptidspacer for å danne enkjedede Fv-repertoarer (scFv). I enda en annen teknikk anvendes "PCR-sammenstilling i cellen" til å kombinere VH- og VL-gener i lymfocytter av PCR og deretter klone repertoarer av bundne gener som beskrevet i Embleton et al., *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831–3837 (1992).

10

Antistoffene fremstilt av naive biblioteker (enten naturlig eller syntetisk) kan ha moderat affinitet (K_d^{-1} på ca. 10^6 til 10^7 M^{-1}), men affinitetsmodning kan også kopieres in vitro ved konstruksjon og reseleksjon fra sekundære biblioteker som beskrevet i Winter et al. (1994) ovenfor. Mutasjon kan for eksempel introduseres

15 tilfeldig in vitro ved hjelp av feilutsatt polymerase (rapportert i Leung et al., *Technique*, 1: 11–15 (1989)) i fremgangsmåten i Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889–896 (1992) eller i fremgangsmåten i Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576–3580 (1992). Affinitetsmodning kan i tillegg utføres ved tilfeldig mutasjon av én eller flere CDR-er, f.eks. ved hjelp av PCR med primere som

20 bærer tilfeldig sekvens over CDR-en av interesse i valgte individuelle Fv-kloner, og screening for kloner med høyere affinitet. WO 9607754 (publisert 14. mars 1996) beskrev en fremgangsmåte for induksjon av mutagenese i en komplementaritetsbestemmende region i et immunoglobulins lette kjede for å danne et bibliotek av gener i den lette kjeden. En annen effektiv metode er å

25 rekombinere VH- eller VL-domenene valgt ved fagvisning med repertoarer av naturlig forekommende V-domenevarianter oppnådd fra ikke-immuniserte donorer og screene for høyere affinitet i flere runder med kjedeombytting som beskrevet i Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779–783 (1992). Denne teknikken gir mulighet for produksjon av antistoffer og antistoffragmenter med affinitet på

30 høyst ca. 10^{-9} M .

Screening av bibliotekene kan oppnås ved forskjellige teknikker kjent i teknikken. CD79b kan for eksempel anvendes til å belegge brønnene i adsorpsjonsplater, uttrykt på vertsceller vedheftet adsorpsjonsplater eller

35 anvendt til celledatering, eller konjugert til biotin for innfangning med

streptavidinbelagte kuler, eller anvendt i en hvilken som helst annen fremgangsmåte for panorering av fagvisningsbiblioteker.

Fagbiblioteksprøvene bringes i kontakt med immobilisert CD79b under
 5 betingelser som egner seg til binding av minst en del av fagpartiklene med
 adsorpsjonsstoffet. Betingelsene, herunder pH, ionestyrke, temperatur og
 lignende, velges normalt for å kopiere fysiologiske betingelser. Fagene bundet til
 den faste fasen skylles og elueres deretter med syre, f.eks. som beskrevet i
 Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978–7982 (1991), eller med alkali,
 10 f.eks. som beskrevet i Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581–597 (1991), eller med
 CD79b-antigenkompetisjon, f.eks. i en prosedyre lik
 antigenkompetisjonsmetoden i Clackson et al., Nature, 352: 624–628 (1991).
 Fager kan anrikes 20–1000 ganger i en enkelt seleksjonsrunde. De anrikede
 fagene kan videre dyrkes i bakteriell kultur og underkastes ytterligere
 15 seleksjonsrunder.

Seleksjonseffektiviteten avhenger av mange faktorer, herunder
 dissosiasjonskinetikken under skylling, og hvorvidt flere antistofffragmenter på et
 enkelt fag kan vekselvirke samtidig med antigen. Antistoffer med hurtig
 20 dissosiasjonskinetikk (og svak bindingsaffinitet) kan beholdes ved hjelp av korte
 skyllinger, multivalent fagvisning og høy beleggdensitet av antigen i fast fase.
 Den høye densiteten stabiliserer ikke bare faget gjennom multivalente
 vekselvirkninger, men fremmer rebinding av fag som har dissosiert. Seleksjonen
 av antistoffer med langsom dissosiasjonskinetikk (og god bindingsaffinitet) kan
 25 fremmes ved hjelp av lange skyllinger og monovalent fagvisning som beskrevet i
 Bass et al., Proteins, 8: 309–314 (1990) og i WO 92/09690, og en lav
 beleggdensitet av antigen som beskrevet i Marks et al., Biotechnol., 10: 779–
 783 (1992).

30 Det er mulig å velge mellom fagantistoffer med forskjellig affinitet, også med
 affinitet som avviker en smule, for CD79b. Men tilfeldig mutasjon av et valgt
 antistoff (f.eks. som utført i enkelte affinitetsmodningsteknikker) gir
 sannsynligvis opphav til mange mutanter, idet de fleste binder til antigen, og
 noen med høyere affinitet. Med begrensende CD79b kan sjelden høyaffinitetsfag
 35 konkurreres ut. For å beholde alle mutanter med høyere affinitet kan fager
 inkuberes med overskudd av biotinylert CD79b, men med det biotinylerte CD79b

ved en konsentrasjon med lavere molaritet enn målmolaaffinitetskonstanten for CD79b. Bindingsfagene med høy affinitet kan deretter innfanges av streptavidinbelagte paramagnetiske kuler. Slik "likevektsinnfanging" gir mulighet for at antistoffene velges ifølge deres bindingsaffinitet, med sensitivitet som gir

5 mulighet for isolering av mutantkloner med så lite som to gangere høyere affinitet fra et stort overskudd av fager med lavere affinitet. Betingelser som anvendes til skylling av fager bundet til en fast fase, kan også manipuleres for å skille på grunnlag av dissosiasjonskinetikk.

- 10 Anti-CD79b-kloner kan velges basert på aktivitet. I visse utførelsesformer stiller oppfinnelsen til rådighet anti-CD79b-antistoffer som binder til levende celler som naturlig uttrykker CD79b. I en utførelsesform stiller oppfinnelsen til rådighet anti-CD79b-antistoffer som blokkerer bindingen mellom en CD79b-ligand og
- 15 protein. Fv-kloner tilsvarende slike anti-CD79b-antistoffer kan velges ved 1) isolering av anti-CD79b-kloner fra et fagbibliotek som beskrevet ovenfor, og eventuelt amplifikasjon av den isolerte populasjonen av fagkloner ved dyrking av populasjonen i en egnet bakteriell vert, 2) seleksjon av CD79b og et andre protein mot hvilken blokkerende og ikke-blokkerende aktivitet er ønsket i hvert
- 20 tilfelle, 3) adsorpsjon av anti-CD79b-fagklonene til immobilisert CD79b, 4) anvendelse av et overskudd av det andre proteinet for å eluere hvilke som helst uønskede kloner som gjenkjenner CD79b-bindingsdeterminanter som overlapper eller deles med bindingsdeterminantene av det andre proteinet, og 5) eluering av klonene som forblir adsorbert etter trinn (4). Kloner med de ønskede
- 25 blokkerende/ikke-blokkerende egenskapene kan eventuelt anrikes ytterligere ved gjentakelse av seleksjonsprosedyrene beskrevet heri én eller flere ganger.

- DNA som koder for hybridomavlede monoklonale antistoffer eller fagvisnings-Fv-kloner ifølge oppfinnelsen, isoleres og sekvenseres enkelt ved hjelp av
- 30 klassiske prosedyrer (f.eks. ved hjelp av oligonukleotidprimere beregnet på spesifikt å amplifisere de tung- og lettkjede-kodende regionene av interesse fra hybridom- eller fag-DNA-templat). Når DNA-et er isolert, kan det plasseres i ekspresjonsvektorer som deretter transfekteres til vertsceller slik som E.coli-celler, simian-COS-celler, CHO-celler (Chinese Hamster Ovary) eller
- 35 myelomceller som ikke på annen måte produserer antistoffprotein, for å oppnå syntesen av de ønskede monoklonale antistoffene i de rekombinante

vertscellene. Oversiktsartikler om rekombinant ekspresjon i bakterier av antistoffkodende DNA omfatter Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) og Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

5 DNA som koder for Fv-kloner ifølge oppfinnelsen, kan kombineres med kjente DNA-sekvenser som koder for konstante regioner i tung kjede og/eller lett kjede (f.eks. kan de relevante DNA-sekvensene oppnås fra Kabat et al. ovenfor) for å danne kloner som koder for tunge og/eller lette kjeder av full eller delvis lengde. Det vil være underforstått at konstante regioner av enhver isotype kan anvendes
 10 til dette formål, herunder konstante regioner i IgG, IgM, IgA, IgD og IgE, og at slike konstante regioner kan oppnås fra hvilke som helst menneske- eller dyrearter. En Fv-klon avledet av det variable domenets DNA av én dyreart (slik som human art) og deretter fusjonert til den konstante regionens DNA av en annen dyreart for å danne kodingssekvenser for "hybrid" tung kjede og/eller lett
 15 kjede av full lengde, er omfattet av definisjonen av "kimært" og "hybrid" antistoff som anvendt heri. I visse utførelsesformer fusjoneres en Fv-klon avledet av det humane variable domenets DNA til den humane konstante regionens DNA for å danne kodingssekvenser for humane tunge og/eller lette kjeder av full eller delvis lengde.

20

DNA som koder for anti-CD79b-antistoff avledet av et hybridom, kan også modifiseres, f.eks. ved substitusjon av kodingssekvensen med humane konstante domener i tung og lett kjede i stedet for homologe murine sekvenser avledet av hybridomklonen (f.eks. som i fremgangsmåten i Morrison et al., Proc.
 25 Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). DNA som koder for et hybridom- eller Fv-klonavledet antistoff eller fragment, kan modifiseres ytterligere ved kovalent binding til immunglobulinkodingssekvensen av hele eller deler av kodingssekvensen for et ikke-immunglobulin-polypeptid. På denne måten fremstilles "kimære" eller "hybride" antistoffer som har bindingsspesifisiteten til
 30 Fv-klon- eller hybridomklonavledede antistoffer ifølge oppfinnelsen.

C. Antistoffavhengig enzymmediert prolegemiddelbehandling (ADEPT)

Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også anvendes i ADEPT ved konjugering av antistoffet til et prolegemiddelaktiverende enzym som
 35 konverterer et prolegemiddel (f.eks. et kjemoterapeutisk peptidylstoff, se

WO81/01145) til et aktivt antikreftlegemiddel. Se for eksempel WO 88/07378 og US-patent nr. 4 975 278.

Immunkonjugatets enzymkomponent som er nyttig for ADEPT, omfatter et
5 hvilket som helst enzym som kan virke på et prolegemiddel på en slik måte at det omdannes til en mer aktiv, cytotoksisk form.

Enzymer som er nyttige i fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelse, omfatter blant annet alkalisk fosfatase som er nyttig for omdannelse av fosfatholdige
10 prolegemidler til frie legemidler, arylsulfatase som er nyttig for omdannelse av sulfatholdige prolegemidler til frie legemidler, cytosindeaminase som er nyttig for omdannelse av ikke-toksisk 5-fluorcytosin til antikreftlegemiddelet 5-fluoruracil, proteaser, slik som serratiaprotease, termolysin, subtilisin, karboksypeptidaser og kathepsiner (slik som kathepsin B og L), som er nyttige for omdannelse av
15 peptidholdige prolegemidler til frie legemidler, D-alanylkarboksypeptidaser som er nyttige for omdannelse av prolegemidler som inneholder D-aminosyresubstituent, karbohydratspaltende enzymer slik som β -galaktosidase og neuraminidase som er nyttige for omdannelse av glykosylerte prolegemidler til frie legemidler, β -laktamase som er nyttig for omdannelse av legemidler som
20 avledes med β -laktamer til frie legemidler, og penicillinamidaser, slik som penicillin V-amidase eller penicillin G-amidase som er nyttig for omdannelse av legemidler avledet ved deres aminnitrogener med henholdsvis fenoksyacetyl- eller fenylacetylgrupper til frie legemidler. Antistoffer med enzymatisk aktivitet, også kjent i teknikken som "abzymer", kan eventuelt anvendes til å omdanne
25 prolegemidlene ifølge oppfinnelsen til frie aktive legemidler (se for eksempel Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Antistoffabzymkonjugater kan være fremstilt som beskrevet heri for tilførsel av abzymet til en tumorcellepopulasjon.

Enzymene ifølge denne oppfinnelse kan være kovalent bundet til anti-CD79b-
30 antistoffene ved teknikker som er velkjent i teknikken slik som anvendelse av de ovenfor behandlede heterobifunksjonelle kryssbindingsreagensene. Fusjonsproteiner omfattende minst antigenbindingsregionen av et antistoff ifølge oppfinnelsen bundet til minst en funksjonelt aktiv del av et enzym ifølge oppfinnelsen kan eventuelt konstrueres ved hjelp av rekombinante DNA-
35 teknikker som er velkjent i teknikken (se for eksempel Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)).

D. Anti-CD79b-antistoff

I tillegg til de heri beskrevne anti-CD79b-antistoffene er det tenkt at anti-CD79b-antistoffvarianter kan fremstilles. Anti-CD79b antistoffvarianter kan fremstilles ved tilførsel av relevante nukleotidendringer til det kodende DNA-et, og/eller ved syntese av det ønskede antistoffet eller polypeptidet. Fagpersoner vil forstå at aminosyreendringer kan endre anti-CD79b-antistoffets post-translasjonale prosesser, slik som endring av glykosyleringssteders antall eller posisjon eller endring av membranforankringskarakteristikkene.

10

Variasjoner i de heri beskrevne anti-CD79b-antistoffene kan utføres for eksempel ved hjelp av hvilke som helst av teknikkene og retningslinjene for konservative og ikke-konservative mutasjoner beskrevet for eksempel i US-patent nr. 5 364 934. Variasjonene kan være en substitusjon, delesjon eller insersjon av én eller flere kodoner som koder for antistoffet eller polypeptidet som resulterer i en endring i aminosyresekvensen sammenlignet med den naturlig forekommende sekvensens antistoff eller polypeptid. Variasjonen er eventuelt ved substitusjon av minst én aminosyre med en hvilken som helst aminosyre i én eller flere av domenene i anti-CD79b-antistoffet. Veiledning i bestemmelse av hvilken aminosyrerest som kan innsettes, substitueres eller slettes uten å få negativ virkning på den ønskede aktiviteten, kan finnes ved sammenligning av anti-CD79b-antistoffets sekvens med den for homologe kjente proteinmolekyler og begrense antallet aminosyresekvensendringer i regioner med høy homologi. Aminosyresubstitusjoner kan være resultatet av utbytting av én aminosyre med en annen aminosyre med lignende strukturelle og/eller kjemiske egenskaper, slik som utbyttingen av et leucin med et serin, dvs. konservative aminosyreutbyttinger. Insersjoner eller delesjoner kan eventuelt være i området fra ca. 1 til 5 aminosyrer. Den tillatte variasjonen kan bestemmes ved systematiske insersjoner, delesjoner eller substitusjoner av aminosyrer i sekvensen, og testing av de resulterende variantene for aktivitet som den naturlig forekommende sekvensen av full lengde eller den modne, naturlig forekommende sekvensen viser.

15

20

25

30

35

Anti-CD79b-antistofffragmenter er stilt til rådighet heri. Slike fragmenter kan trunkeres ved N-terminalen eller C-terminalen, eller mangle indre enheter, f.eks. når de sammenlignes med et naturlig forekommende antistoff eller protein av

full lengde. Visse fragmenter mangler aminosyreenheter som ikke er vesentlige for en ønsket biologisk aktivitet for anti-CD79b-antistoffet.

- Anti-CD79b-antistofffragmenter kan fremstilles ved en hvilken som helst av en rekke klassiske teknikker. Ønskede peptidfragmenter kan syntetiseres kjemisk. En alternativ metode omfatter dannelsen av antistoff- eller polypeptidfragmenter ved enzymatisk nedbryting, f.eks. ved behandling av proteinet med et enzym kjent for å spalte proteiner på steder definert av særlige aminosyreenheter, eller ved nedbryting av DNA-et med egnede restriksjonsenzymmer og isolering av det ønskede fragmentet. Enda en annen egnet teknikk omfatter isolering og amplifikasjon av et DNA-fragment som koder for et ønsket antistoff- eller polypeptidfragment, ved polymerasekjedereaksjon (PCR). Oligonukleotider som definerer de ønskede terminalene av DNA-fragmentet, benyttes ved 5'- og 3'-primerne i PCR-et. Anti-CD79b-antistofffragmenter deler fortrinnsvis minst én biologisk og/eller immunologisk aktivitet med det heri beskrevne naturlig forekommende anti-CD79b-antistoffet.

- I særlige utførelsesformer er konservative substitusjoner av interesse angitt i tabell 8 under overskriften Foretrukne substitusjoner. Hvis slike substitusjoner resulterer i en endring i biologisk aktivitet, introduseres mer vesentlige endringer, kalt eksempelsubstitusjoner i tabell 8, eller som ytterligere beskrevet nedenfor med henvisning til aminosyreklasser, og produktene screenes.

Tabell 8

Original-rest	Eksempel-substitusjoner	Foretrukne substitusjoner
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

Original-rest	Eksempel-substitusjoner	Foretrukne substitusjoner
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucin	leu
Leu (L)	norleucin; 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; norleucin	leu

- Vesentlige modifikasjoner i funksjon eller immunologisk identitet for anti-CD79b-antistoffet oppnås ved valg av substitusjoner som skiller seg vesentlig i sin virkning på opprettholdelse av a) polypeptidhovedkjedens struktur i substitusjonens område, f.eks. som en plate eller spiralformet konformasjon, b) molekylets lading eller hydrofobisitet på målstedet, eller c) sidekjedens hoveddel. Naturlig forekommende enheter deles inn i grupper basert på felles sidekjedeegenskaper:

- 1) hydrofob: norleucin, met, ala, val, leu, ile,
- 10 2) nøytral hydrofil: cys, ser, thr,
- 3) sur: asp, glu,
- 4) basisk: asn, gln, his, lys, arg,

5) rester som påvirker kjederetning: gly, pro, og

6) aromatisk: trp, tyr, phe.

Ikke-konservative substitusjoner vil medføre bytte av et medlem av en av disse klassene med en annen klasse. Slike substituerte rester kan også tilføres til de konservative substitusjonsstedene eller, mer fortrinnsvis, til de øvrige (ikke-konserverte) stedene.

Variasjonene kan utføres ved hjelp av fremgangsmåter kjent i teknikken slik som oligonukleotidmediert (stedsrettet) mutagenese, alaninskanning og PCR-mutagenese. Stedsrettet mutagenese (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), kassettmutagenese (Wells et al., Gene, 34:315 (1985)), restriksjonsseleksjonsmutagenese (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)) eller andre kjente teknikker kan utføres på det klonede DNA-et for å produsere anti-CD79b-antistoffvariant-DNA.

Skanningsaminosyreanalyse kan også anvendes til å identifisere én eller flere aminosyrer langs en tilstøtende sekvens. Blant de foretrukne skanningsaminosyrene er relativt små, nøytrale aminosyrer. Slike aminosyrer omfatter alanin, glycin, serin og cystein. Alanin er typisk en foretrukket skanningsaminosyre fra denne gruppen fordi det eliminerer sidekjeden bortenfor betakarbonet og endres mindre sannsynlig til variantens hovedkjedekonformasjon (Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)). Alanin er også typisk foretrukket fordi det er den vanligste aminosyren. Det er videre ofte påvist i både skjulte og eksponerte posisjoner (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)). Hvis alaninsubstitusjon ikke gir tilstrekkelige variantmengder, kan en isoterisk aminosyre anvendes.

30

En hvilken som helst cysteinenhet som ikke er involvert i opprettholdelse av den riktige konformasjon av anti-CD79b-antistoffet, kan også substitueres, alminneligvis med serin, for å forbedre molekylets oksidative stabilitet og forhindre uheldig kryssbinding. Cysteinbindinger kan omvendt tilsettes til anti-

CD79b-antistoffet for å forbedre dets stabilitet (særlig hvor antistoffet er et antistofffragment slik som et Fv-fragment).

En særlig foretrukket type av substitusjonell variant omfatter substitusjon av én eller flere hypervariable regionsenheter av et morantistoff (f.eks. et humanisert eller humant antistoff). De resulterende variantene valgt for videre utvikling vil alminneligvis ha forbedrede biologiske egenskaper i forhold til morantistoffet hvorav de er dannet. En praktisk måte å danne slike substitusjonelle varianter på omfatter affinitetsmodning ved hjelp av fagvisning. Flere hypervariable regionssteder (f.eks. 6–7 steder) muteres kort fortalt for å danne alle mulige aminosubstitusjoner på hvert sted. De således dannede antistoffvariantene vises på en monovalent måte fra filamentøse fagpartikler som fusjoner til gen III-produktet av M13 pakket i hver partikkel. De fagviste variantene screenes deretter for deres biologiske aktivitet (f.eks. bindingsaffinitet) som heri beskrevet. For å identifisere hypervariable kandidatregionssteder for modifikasjon kan alaninskanningsmutagenese utføres for å identifisere hypervariable regionsenheter som bidrar vesentlig til antigenbinding. Det kan eventuelt eller i tillegg være gunstig å analysere en krystallstruktur av antigenantistoffkomplekset for å identifisere kontaktpunkter mellom antistoffet og CD79b-polypeptid. Slike kontaktenheter og omkringliggende enheter er kandidater for substitusjon ifølge teknikkene beskrevet heri. Straks slike varianter er dannet, underkastes panelet av varianter screening som beskrevet heri, og antistoffer med bedre egenskaper i ett eller flere relevante assayer kan velges for videre utvikling.

25 Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensvarianter av anti-CD79b-antistoffet, fremstilles ved en rekke fremgangsmåter som er kjent i teknikken. Disse fremgangsmåtene omfatter blant annet isolering fra en naturlig kilde (ved naturlig forekommende aminosyresekvensvarianter) eller fremstilling av oligonukleotidmediert (eller stedsrettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassettmutagenese av en tidligere fremstilt variant eller en ikke-variantversjon av anti-CD79b-antistoffet.

E. Modifikasjoner av anti-CD79b-antistoffer

- Kovalente modifikasjoner av anti-CD79b-antistoffer er omfattet av denne oppfinnelse. Én type av kovalent modifikasjon omfatter reaksjon av utpekte aminosyreenheter av et anti-CD79b-antistoff med et organisk avledende stoff som kan reagere med valgte sidekjeder eller de N- eller C-terminale enhetene av anti-CD79b antistoffet. Avledning med bifunksjonelle stoffer er nyttig for eksempel for kryssbinding av anti-CD79b-antistoff til en vannuløselig støttematrise eller overflate for anvendelse i fremgangsmåten for rensing av anti-CD79b-antistoffer, og omvendt. Vanlig anvendte kryssbindingsstoffer omfatter for eksempel 1,1-bis(diazoacetyl)-2-fenyletan, glutaraldehyd, N-hydroksysukkinimidestere, f.eks. estere med 4-azidosalisylsyre, homobifunksjonelle imidoestere, herunder disukkinimidylestere slik som 3,3'-ditiobis(sukkinimidylpropionat), bifunksjonelle maleimider slik som bis-N-maleimido-1,8-oktan og stoffer slik som metyl-3-[(p-azidofenyl)ditio]propioimidat.
- Andre modifikasjoner omfatter deamidering av glutaminy- og asparaginylenheter til de i hvert tilfelle tilsvarende glutamyl- og aspartylenhetene, hydroksylering av prolin og lysin, fosforylering av hydroksylgrupper av seryl- eller treonylenheter, metylering av α -aminogruppene av lysin-, arginin- og histidinsidekjedene (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, s. 79–86 (1983)), acetylering av det N-terminale aminet og amidering av en hvilken som helst C-terminal karboksylgruppe.
- En annen type av kovalent modifikasjon av anti-CD79b-antistoffet omfattet av denne oppfinnelse omfatter endring av antistoffets eller polypeptidets naturlig forekommende glykosyleringsmønster. Med "endring av det naturlig forekommende glykosyleringsmønsteret" menes heri delesjon av én eller flere karbohydratenheter i anti-CD79b-antistoff med naturlig forekommende sekvens (enten ved fjerning av det underliggende glykosyleringsstedet eller ved delesjon av glykosyleringen ved kjemiske og/eller enzymatiske midler), og/eller tilsetning av én eller flere glykosyleringssteder som ikke er til stede i anti-CD79b-antistoffet med naturlig forekommende sekvens. Uttrykket omfatter i tillegg kvalitative endringer i glykosyleringen av de naturlig forekommende proteinene, omfattende en endring i de forskjellige tilstedeværende karbohydratenhetenes art og proporsjoner.

Glykosylering av antistoffer og andre polypeptider er typisk enten N-bundet eller O-bundet. Med N-bundet menes binding av karbohydratenheten til sidekjeden av en asparaginenhet. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er en hvilken som helst aminosyre unntatt prolin, er gjenkjenningssekvenser for enzymatisk binding av karbohydratenheten til asparaginsidekjeden. Forekomsten av en hvilken som helst av disse tripeptidsekvensene i et polypeptid danner således et potensielt glykosyleringssted. Med O-bundet glykosylering menes binding av ett av sukrene N-aceylgalaktosamin, galaktose eller xylose til en hydroksyaminosyre, vanligst serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan anvendes.

Tilsetning av glykosyleringssteder til anti-CD79b-antistoffet oppnås enkelt ved endring av aminosyresekvensen slik at det inneholder én eller flere av de ovennevnte tripeptidsekvensene (for N-bundne glykosyleringssteder). Endringen kan også skje ved tilsetning av, eller substitusjon av, én eller flere serin- eller treoninenheter til det opprinnelige anti-CD79b-antistoffets sekvens (for O-bundne glykosyleringssteder). Anti-CD79b-antistoffets aminosyresekvens kan eventuelt endres gjennom endringer på DNA-nivået, særlig ved mutasjon av DNA-et som koder for anti-CD79b-antistoff ved forhåndsvalgte baser slik at det dannes kodoner som vil translaterer til de ønskede aminosyrene.

Et annet middel for å øke antallet karbohydratenheter på anti-CD79b-antistoffet er ved kjemisk eller enzymatisk kobling av glykosider til polypeptidet. Slike fremgangsmåter er beskrevet i teknikken, f.eks. i WO 87/05330 publisert 11. september 1987, og i Aplin og Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., s. 259–306 (1981).

Fjerning av karbohydratenheter på anti-CD79b-antistoffet kan oppnås kjemisk eller enzymatisk eller ved mutasjonell substitusjon av kodoner som koder for aminosyreenheter som fungerer som mål for glykosylering. Kjemiske deglykosyleringsteknikker er kjent i teknikken og beskrevet for eksempel i Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) og i Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). Enzymatisk spalting av karbohydratenheter på

polypeptider kan oppnås ved anvendelse av en rekke endo- og eksoglykosidaser som beskrevet i Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

En annen type av kovalent modifikasjon av anti-CD79b-antistoff omfatter
 5 binding av antistoffet til én av en rekke ikke-proteinholdige polymerer, f.eks. polyetylenglykol (PEG), polypropylenglykol eller polyoksyalkylener på måten beskrevet i US-patent nr. 4 640 835, 4 496 689, 4 301 144, 4 670 417, 4 791 192 eller 4 179 337. Antistoffet kan også innkapsles i mikrokapsler fremstilt for eksempel ved koacerveringsteknikker eller ved
 10 fasegrensepolymerisering (f.eks. henholdsvis hydroksymetylcellulose eller gelatinmikrokapsler og poly-(metylmetylacrylat)mikrokapsler) i kolloidale legemiddeltilførselssystemer (f.eks. liposomer, albuminmikrosfærer, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition,
 15 Oslo, A., Ed., (1980).

Anti-CD79b-antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også modifiseres på en måte for å danne kimære molekyler omfattende et anti-CD79b-antistoff fusjonert til et annet, heterologt polypeptid eller aminosyresekvens.

20

I en utførelsesform omfatter et slikt kimært molekyl en fusjon av anti-CD79b-antistoffet med et markørpolypeptid som stiller til rådighet en epitop hvortil et antimarkørantistoff kan binde selektivt. Epitopmarkøren plasseres alminneligvis ved amino- eller karboksylterminalen av anti-CD79b-antistoffet. Forekomsten av
 25 slike epitopmerkede former av anti-CD79b-antistoffet kan påvises ved hjelp av et antistoff mot markørpolypeptidet. Tilveiebringelse av epitopmarkøren setter også anti-CD79b-antistoffet i stand til enkelt å renses ved affinitetsrensing ved hjelp av et antimarkørantistoff eller en annen type av affinitetsmatrise som binder til epitopmarkøren. Forskjellige markørpolypeptider og deres respektive
 30 antistoffer er velkjent i teknikken. Eksempler omfatter poly-histidin- (poly-his) eller poly-histidin-glycinmarkører (poly-his-gly), influensa-HA-markørpolypeptidet og dets antistoff 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159–2165 (1988)), c-myc-markøren og dets 8F9-, 3C7-, 6E10-, G4-, B7- og 9E10-antistoffer (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610–3616 (1985)) og
 35 herpes simplex-virus-glykoprotein D-markøren (gD) og dets antistoff (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547–553 (1990)). Andre markørpolypeptider

omfatter Flag-peptid (Hopp et al., BioTechnology, 6:1204–1210 (1988)), KT3-epitoppeptidet (Martin et al., Science, 255:192–194 (1992)), α -tubulinepitoppeptid (Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163–15166 (1991)) og T7-gen 10-proteinpeptidmarkøren (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393–6397 (1990)).

I en alternativ utførelsesform kan det kimære molekylet omfatte en fusjon av anti-CD79b-antistoffet med et immunglobulin eller en særlig region av et immunglobulin. For en bivalent form av det kimære molekylet (også betegnet "immunadhesin") kan en slik fusjon være til Fc-regionen av et IgG-molekyl. Ig-fusjonene omfatter fortrinnsvis substitusjonen av en løselig (slettet eller inaktivert transmembrant domene) form av et anti-CD79b-antistoff i stedet for minst én variabel region i et Ig-molekyl. I en særlig foretrukket utførelsesform omfatter immunglobulinfusjonen hengselet, CH₂ og CH₃, eller hengselet, CH₁-, CH₂- og CH₃-regioner av et IgG1-molekyl. Produksjonen av immunglobulinfusjoner er også angitt i US-patent nr. 5 428 130 utstedt 27. juni 1995.

F. Fremstilling av anti-CD79b-antistoffer

Beskrivelsen nedenfor angår primært produksjon av anti-CD79b-antistoffer ved dyrking av celler omdannet eller transfektert med en vektor inneholdende anti-CD79b-antistoffkodende nukleinsyre. Det er naturligvis tenkt at alternative fremgangsmåter, som er velkjent i teknikken, kan anvendes til å fremstille anti-CD79b-antistoffer. Den relevante aminosyresekvensen, eller deler derav kan for eksempel fremstilles ved direkte peptidsyntese ved hjelp av fastfaseteknikker (se for eksempel Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149–2154 (1963)). *Proteinsyntese in vitro* kan utføres ved hjelp av manuelle teknikker eller automatisasjon. Automatisert syntese kan oppnås for eksempel ved hjelp av en Applied Biosystems-peptidsyntetisator (Foster City, CA) etter produsentens bruksanvisning. Forskjellige deler av anti-CD79b-antistoffet kan syntetiseres kjemisk separat og kombineres ved hjelp av kjemiske eller enzymatiske fremgangsmåter for å produsere det ønskede anti-CD79b-antistoffet.

1. Isolering av DNA-kodende anti-CD79b-antistoff

DNA som koder for anti-CD79b-antistoffer, kan oppnås fra et cDNA-bibliotek fremstilt av vev som antas å inneholde anti-CD79b-antistoff-mRNA og uttrykke det på et påvisbart nivå. Humant anti-CD79b-antistoff-DNA kan følgelig enkelt
5 oppnås fra et cDNA-bibliotek fremstilt fra humant vev. Det anti-CD79b-antistoffkodende genet kan også oppnås fra et genomisk bibliotek eller ved kjente syntetiske prosedyrer (f.eks. automatisert nukleinsyresyntese).

Bibliotekene kan screenes med sonder (slik som oligonukleotider med minst ca.
10 20–80 baser) beregnet på å identifisere genet av interesse eller proteinet kodet av det. Screening av cDNA-et eller genomisk bibliotek med den valgte sonden kan gjennomføres ved hjelp av standardprosedyrer, slik som beskrevet i Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Et alternativt middel for å isolere genet som
15 koder for anti-CD79b-antistoff, er å anvende PCR-metodologi (Sambrook et al. ovenfor: Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

Teknikker for screening av et cDNA-bibliotek er velkjent i teknikken.
20 Oligonukleotidsekvensene valgt som sonder bør være av tilstrekkelig lengde og tilstrekkelig utvetydige til at falske positive begrenses. Oligonukleotidet merkes fortrinnsvis slik at det kan påvises ved hybridisering til DNA i biblioteket som screenes. Fremgangsmåter for merking er velkjent i teknikken og omfatter anvendelse av radiomarkører som ³²P-merket ATP, biotinylering eller
25 enzymmerking. Hybridiseringsbetingelser, herunder moderat strenghet og høy strenghet, er stilt til rådighet i Sambrook et al. ovenfor.

Sekvenser identifisert i slike bibliotekscreeningsmetoder kan sammenlignes og sammenstilles med andre kjente sekvenser deponert og tilgjengelige i offentlige
30 databaser slik som GenBank eller andre private sekvensdatabaser. Sekvensidentitet (enten på aminosyre- eller nukleotidnivå) i definerte regioner av molekylet eller over sekvensen av full lengde kan bestemmes ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent i teknikken, og som beskrevet heri.

35 Nukleinsyre med proteinkodingssekvens kan oppnås ved screeningvalgt cDNA eller genomiske biblioteker ved hjelp av den deduserte aminosyresekvensen

beskrevet heri for første gang, og om nødvendig ved hjelp av klassiske primerekstensjonsprosedyrer som beskrevet i Sambrook et al. ovenfor, for å påvise forløpere og behandle mellomprodukter av mRNA som kanskje ikke er omvendt transkribert til cDNA.

5 **2. Seleksjon og omdannelse av vertsceller**

Vertsceller transfekteres eller omdannes med ekspresjons- eller kloningsvektorer beskrevet heri for anti-CD79b-antistoffproduksjon og dyrket i klassiske næringsstoffmedier modifisert som relevant for induksjon av promotorer, seleksjon av transformanter eller amplifikasjon av genene som koder for 10 ønskede sekvenser. Kulturbetingelsene, slik som medium, temperatur, pH og lignende, kan velges av den erfarne fagpersonen uten unødig eksperimentering. Prinsipper, protokoller og praktiske teknikker for maksimering av produktiviteten for cellekulturer kan finnes i Mammalian Cell Biotechnology: a Practical 15 Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) og Sambrook et al. ovenfor.

Fremgangsmåter for eukaryotisk celletransfeksjon og prokaryotisk celleomdannelse, som betyr innsetting av DNA i verten slik at DNA-et er repliserbart, enten som et ekstrakromosom eller ved kromosomintegrering, er 20 kjent for fagpersoner, f.eks. CaCl_2 , CaPO_4 , liposom-mediert, polyetylenglykol/DMSO og elektroporering. Avhengig av den anvendte vertscellen utføres transformasjon ved hjelp av standardteknikker egnet for slike celler. Kalsiumbehandlingen som anvender kalsiumklorid, som beskrevet i Sambrook et al., ovenfor, eller elektroporering, anvendes alminneligvis til prokaryoter. 25 Infeksjon med *Agrobacterium tumefaciens* anvendes til omdannelse av visse planteceller, som beskrevet i Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) og WO 89/05859 publisert 29. juni 1989. For pattedyrceller uten slike cellevegger kan kalsiumfosfatutfellingsmetoden i Graham and van der Eb, Virology, 52:456–457 (1978) anvendes. Generelle aspekter ved 30 pattedyrcellevertssystemtransfeksjoner er beskrevet i US-patent nr. 4 399 216. Omdannelser til gjær utføres typisk ifølge fremgangsmåten i Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) og Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Men andre fremgangsmåter for tilførsel av DNA til celler, slik som ved nukleær mikroinjeksjon, elektroporering, bakteriell protoplastfusjon med intakte 35 celler eller polykationer, f.eks. polybren, polyornitin, kan også anvendes.

Forskjellige teknikker for omdannelse av pattedyrceller er beskrevet i Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527–537 (1990) og Mansour et al., *Nature*, 336:348–352 (1988).

- 5 Egnede vertsceller for kloning eller ekspresjon av DNA-et i vektorene heri omfatter prokaryotiske celler, gjærceller eller høyere eukaryotiske celler.

a. Prokaryotiske vertsceller

- Egnede prokaryoter omfatter blant annet arkebakterier og eubakterier, slik som
- 10 gramnegative eller grampositive organismer, f.eks. Enterobacteriaceae slik som *E. coli*. Forskjellige *E. coli*-stammer er offentlig tilgjengelige, slik som *E. coli* K12-stamme MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli*-stamme W3110 (ATCC 27,325) og K5 772 (ATCC 53,635). Andre egnede prokaryotiske
 - 15 vertsceller omfatter Enterobacteriaceae slik som *Escherichia*, f.eks. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, f.eks. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, f.eks. *Serratia marcescans* og *Shigella* samt *Bacilli* slik som *B. subtilis* og *B. licheniformis* (f.eks. *B. licheniformis* 41P beskrevet i DD 266,710 publisert 12. april 1989), *Pseudomonas* slik som *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* og *Streptomyces*. Disse eksemplene er
 - 20 illustrative og ikke begrensende. Stamme W3110 er en særlig foretrukket vert eller morvert fordi den er en vanlig vertsstamme for rekombinante DNA-produktgjæringer. Vertscellen utskiller fortrinnsvis minimale mengder av proteolytiske enzymer. Stamme W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), s.
 - 25 1190–1219; ATCC-deponeringsnr. 27,325) kan for eksempel modifiseres for å fremme en genetisk mutasjon i genene som koder for proteiner som er endogene for verten, hvor eksempler på slike verter omfatter *E. coli* W3110-stamme 1A2, som har den komplette genotypen *tonA*; *E. coli* W3110-stamme 9E4, som har den komplette genotypen *tonA ptr3*; *E. coli* W3110-stamme 27C7
 - 30 (ATCC 55,244), som har den komplette genotypen *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; *E. coli* W3110-stamme 37D6, som har den komplette genotypen *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110-stamme 40B4, som er stamme 37D6 med en ikke-kanamycinresistant *degP*-delesjonsmutasjon; *E. coli* W3110-stamme 33D3 med genotype W3110
 - 35 $\Delta fhuA (\Delta tonA) ptr3 lac Iq lacL8 \Delta ompT \Delta (nmpc-fepE) degP41 kan^R$ (US-patent

nr. 5 639 635) og en *E. coli*-stamme med mutant periplasmisk protease beskrevet i US-patent nr. 4 946 783 utstedt 7. august 1990. Andre stammer og derivater derav, slik som *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) og *E. coli* RV308(ATCC 31,608) er også egnet. Disse eksemplene

5 er illustrative og ikke begrensende. Fremgangsmåter for konstruksjon av derivater av alle de ovennevnte bakteriene med definerte gentyper er kjent i teknikken og beskrevet i for eksempel Bass et al., Proteins, 8:309–314 (1990). Det er alminneligvis nødvendig å velge den egnede bakterien med hensyn til replikonets replikasjonsevne i cellene av en bakterie. *E. coli*-, *Serratia*- eller

10 *Salmonella*-arter kan passende anvendes som vert når velkjente plasmider slik som pBR322, pBR325, pACYC177 eller pKN410 anvendes til å supplere replikonet. Vertscellen bør typisk utskille minimale mengder av proteolytiske enzymer, og ytterligere proteaseinhiberer kan ønskelig inkorporeres i cellekulturen. Fremgangsmåter for kloning *in vitro*, f.eks. PCR eller andre

15 nukleinsyrepolymerasereaksjoner, er eventuelt egnet.

Antistoffer av full lengde, antistoffragmenter og antistoffusjonsproteiner kan fremstilles i bakterier, særlig når glykosylering og Fc-effektorfunksjon ikke er nødvendig, slik som når det terapeutiske antistoffet konjugeres til et cytotoksisk

20 stoff (f.eks. et toksin) og immunkonjugatet på egen hånd viser effekt ved tumorcelledestruksjon. Antistoffer av full lengde har større halveringstid i sirkulasjon. Produksjon i *E. coli* er raskere og mer kostnadseffektivt. Informasjon om ekspresjon av antistoffragmenter og polypeptider i bakterier finnes i for eksempel US 5 648 237 (Carter et. al.), US 5 789 199 (Joly et al.) og US

25 5 840 523 (Simmons et al.) som beskriver translasjonsinitieringsregion (TIR) og signalsekvenser for optimalisering av ekspresjon og utskilling, hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri. Etter ekspresjon isoleres antistoffet fra *E. coli*-cellepastaen i en løselig fraksjon og kan renses gjennom for eksempel en protein A- eller G-kolonne, avhengig av isotypen. Siste rensing kan utføres

30 på samme måte som fremgangsmåten for rensing av et antistoff uttrykt for eksempel i CHO-celler.

b. Eukaryotiske vertsceller

I tillegg til prokaryoter er eukaryotiske mikrober slik som filamentøs sopp eller

35 gjær egnede klonings- eller ekspresjonsverter for anti-CD79b-antistoff som

koder for vektorer. *Saccharomyces cerevisiae* er en alminnelig anvendt eukaryotisk vertsmikroorganisme. Andre omfatter *Schizosaccharomyces pombe* (Beach og Nurse, Nature, 290: 140 (1981), EP 139 383 publisert 2. mai 1985), *Kluyveromyces*-verter (US-patent nr. 4 943 529; Fleer et al., Bio/Technology, 5 9:968-975 (1991)) slik som for eksempel *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574, Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16 045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56 500), *K. drosophilae* (ATCC 36 906, Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* og *K. marxianus*; *Yarrowia* 10 (EP 402 226), *Pichia pastoris* (EP 183 070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)), *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244 234), *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)); *Schwanniomyces* slik som *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394 538 publisert 31. oktober 1990) og filamentøs sopp slik som for eksempel *Neurospora*, 15 *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publisert 10. januar 1991) og *Aspergillus*-verter slik som *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)) og *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 (1985)). Metylotropisk gjær er egnet heri 20 og omfatter blant annet gjær som er i stand til å vokse på metanol valgt fra slektene omfattende *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* og *Rhodotorula*. En liste over spesifikke arter som er eksempler på denne gjærklassen, finnes i C. Anthony, The Biochemistry of methylotrophs, 269 (1982).

25

Egnede vertsceller for ekspresjon av glykosylert anti-CD79b-antistoff er avledet av flercellulære organismer. Eksempler på virvelløse celler omfatter insektsceller, slik som *Drosophila*-S2 og *Spodoptera*-Sf9, samt planteceller, slik som cellekulturer av bomull, mais, potet, soyabønne, petunia, tomat og tobakk. En 30 rekke bakulovirale stammer og varianter og tilsvarende permissive insektsceller fra verter slik som *Spodoptera frugiperda* (larve), *Aedes aegypti* (mygg), *Aedes albopictus* (mygg), *Drosophila melanogaster* (fruktflue), og *Bombyx mori* er identifisert. En rekke virale stammer for transfeksjon er offentlig tilgjengelige, f.eks. L-1-varianten av *Autographa californica* NPV og Bm- 35 5-stammen av *Bombyx mori* NPV, og slike virus kan anvendes som viruset heri

ifølge den foreliggende oppfinnelse, særlig for transfeksjon av *Spodoptera frugiperda*-celler.

- Men interessen er størst for virveldyrceller, og spredning av virveldyrceller i kultur (vevskultur) er blitt en rutineprosedyre. Eksempler på nyttige pattedyrvertscellelinjer er CV1-linje fra apenyre omdannet av SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), human embryonal nyrecellelinje (293 eller 293 celler subklonet for vekst i suspensjonskultur, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)), nyreceller fra hamsterunge (BHK, ATCC CCL 10), CHO-celler (Chinese hamster ovary)/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)), sertoliceller fra mus (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)), nyreceller fra ape (CV1 ATCC CCL 70), nyreceller fra afrikansk grønn marekatt (VERO-76, ATCC CRL-1587), humane livmorhalskarsinomceller (HELA, ATCC CCL 2), nyreceller fra hunder (MDCK, ATCC CCL 34), leverceller fra buffalorotter (BRL 3A, ATCC CRL 1442), humane lungeceller (W138, ATCC CCL 75), humane leverceller (Hep G2, HB 8065) brysttumor hos mus (MMT 060562, ATCC CCL51), TRI-celler (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)), MRC-5-celler, FS4-celler og en human hepatomlinje (Hep G2).
- Vertsceller omdannes med de ovennevnte ekspresjons- eller kloningsvektorene for anti-CD79b-antistoffproduksjon og dyrkes i klassiske næringsstoffmedier modifisert som relevant for induksjon av promotorer, seleksjon av transformanter eller amplifikasjon av genene som koder for ønskede sekvenser.

3. Seleksjon og anvendelse av en repliserbar vektor

- For rekombinant produksjon av et antistoff ifølge oppfinnelsen isoleres nukleinsyren (f.eks. cDNA eller genomisk DNA) som koder for den og innsettes i en repliserbar vektor for videre kloning (amplifikasjon av DNA-et) eller for ekspresjon. DNA som koder for antistoffet, isoleres lett og sekvenseres ved hjelp av klassiske fremgangsmåter (f.eks. ved hjelp av oligonukleotidsonder som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for tunge og lette kjeder i antistoffet). En rekke vektorer er tilgjengelige. Valget av vektor avhenger delvis av vertscellen som skal anvendes. Foretrukne vertsceller er alminneligvis enten av prokaryotisk eller eukaryotisk (vanligvis pattedyr) opprinnelse.

Vektoren kan for eksempel være i form av et plasmid, et kosmid, en viralpartikkel eller et fag. Den egnede nukleinsyresekvensen kan innsettes i vektoren ved hjelp av en rekke forskjellige prosedyrer. DNA-et innsettes alminneligvis på egnede restriksjonsendonukleasesteder ved hjelp av
 5 fremgangsmåter som er kjent i teknikken. Vektorkomponenter omfatter vanligvis blant annet én eller flere av en signalsekvens, et replikasjonsorigin, én eller flere markørgener, et enhancerelement, en promotor og en transkripsjonstermineringssekvens. Konstruksjon av egnede vektorer inneholdende én eller flere av disse komponentene anvender
 10 standardligerings teknikker som er kjent for fagpersoner.

CD79b kan fremstilles rekombinant, ikke bare direkte, men også som et fusjonspolypeptid med et heterologt polypeptid, som kan være en signalsekvens eller andre polypeptider med et spesifikt spaltingssted ved N-terminalen av det
 15 modne proteinet eller polypeptidet. Signalsekvensen kan alminneligvis være en komponent av vektoren, eller den kan være en del av anti-CD79b-antistoffet som koder for DNA som er innsatt i vektoren. Signalsekvensen kan være en prokaryotisk signalsekvens valgt for eksempel fra gruppen med alkalisk fosfatase, penicillinase, lpp eller varmemestabile enterotoksin-II-ledere. For
 20 gjæringsutskilling kan signalsekvensen være for eksempel gjæringsinvertaseleder, alfafaktorleder (omfattende *Saccharomyces*- og *Kluyveromyces* α -faktorledere, sistnevnte beskrevet i US-patent nr. 5 010 182) eller syrefosfataseleder, *C. albicans*-glukoamylaseleder (EP 362 179 publisert 4. april 1990) eller signalet beskrevet i WO 90/13646 publisert 15. november 1990.
 25 I pattedyrcelleekspresjon kan pattedyrsignalsekvenser anvendes til direkte utskilling av proteinet, slik som signalsekvenser fra utskilte polypeptider av samme eller beslektede arter samt virale sekretoriske ledere.

a. Prokaryotiske vertsceller

30 Polynukleotidsekvenser som koder for polypeptidkomponenter av antistoffet ifølge oppfinnelsen, kan oppnås ved hjelp av rekombinante standardmetoder. Ønskede polynukleotidsekvenser kan isoleres og sekvenseres fra antistoffproduserende celler, slik som hybridomceller. Polynukleotider kan eventuelt syntetiseres ved hjelp av nukleotidsyntetisor eller PCR-teknikker. Når
 35 sekvenser som koder for polypeptider er oppnådd, innsettes de i en rekombinant

vektor som kan replisere og uttrykke heterologe polynukleotider i prokaryotiske verter. Mange vektorer som er tilgjengelige og kjent i teknikken, kan anvendes til formålet ifølge den foreliggende oppfinnelse. Seleksjon av en egnet vektor vil hovedsakelig avhenge av størrelsen på nukleinsyrene som skal innsettes i vektoren, og den særlige vertscellen som skal omdannes sammen med vektoren. Hver vektor inneholder forskjellige komponenter avhengig av dens funksjon (amplifikasjon eller ekspresjon av heterologt polynukleotid, eller begge) og dens forenlighet med den særlige vertscellen hvor den finnes.

- 10 Plasmidvektorer inneholdende replikon- og kontrollsekvenser som er avledet av arter som er forenlige med vertscellen, anvendes alminneligvis i sammenheng med disse vertene. Både ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder en nukleinsyresekvens som gjør vektoren i stand til å replisere i én eller flere valgte vertsceller, og merke sekvenser som kan stille til rådighet fenotypisk seleksjon i omdannede celler. Slike sekvenser er velkjent for en rekke bakterier, gjær og virus. Replikasjonsoriginet fra plasmid-pBR322, som inneholder gener som koder for ampicillin-(Amp) og tetracyclin(Tet)-resistans og dermed stiller til rådighet enkle midler for identifikasjon av omdannede celler, er egnet for de fleste gramnegative bakterier, 2 μ -plasmidoriginet er egnet for gjær, og forskjellige virale originer (SV40, polyom, adenovirus, VSV eller BPV) er nyttige for kloning av vektorer i pattedyrceller. pBR322, dets derivater eller andre mikrobeplasmider eller bakteriofag kan også inneholde, eller modifiseres til å inneholde, promotorer som kan anvendes av mikrobeorganismen for ekspresjon av endogene proteiner. Eksempler på pBR322-derivater anvendt for ekspresjon av særlige antistoffer er beskrevet i detalj i Carter et al., US-patent nr. 5 648 237.

- 30 Fagvektorer inneholdende replikon- og kontrollsekvenser som er forenlige med vertsmikroorganismen, kan videre anvendes som omdannelsesvektorer i sammenheng med disse vertene. Bakteriofag slik som λ GEM.TM.-11 kan for eksempel anvendes til fremstilling av en rekombinant vektor som kan anvendes til omdannelse av mottagelige vertsceller, slik som *E. coli* LE392.

- 35 Ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen kan omfatte to eller flere promotor-cistronpar, som koder for hver av polypeptidkomponentene. En promotor er en utranslatert regulatorisk sekvens plassert oppstrøms (5') for et cistron som

modulerer dens ekspresjon. Prokaryotiske promotorer deles typisk inn i to klasser, inducible og konstitutive. En inducibel promotor er en promotor som initierer økte nivåer av transkripsjon av cistronet under dens kontroll som svar på endringer i kulturtilstanden, f.eks. forekomst eller fravær av et næringsstoff
5 eller en endring i temperatur.

Et stort antall promotorer gjenkjent av en rekke potensielle vertsceller er velkjent. Den valgte promotoren kan være operativt bundet til cistron-DNA som koder for lett eller tung kjede ved å fjerne promotoren fra kilde-DNA-et via
10 restriksjonsenzymnedbryting og innsetting av den isolerte promotorsekvensen i vektoren ifølge oppfinnelsen. Både den naturlig forekommende promotorsekvensen og mange heterologe promotorer kan anvendes til direkte amplifikasjon og/eller ekspresjon av målgenene. I noen utførelsesformer anvendes heterologe promotorer siden de alminneligvis tillater større
15 transkripsjon og høyere utbytte av uttrykt målgen sammenlignet med den naturlig forekommende målpolypeptidpromotoren.

Promotorer som er gjenkjent av en rekke potensielle vertsceller, er velkjent. Promotorer som egner seg til anvendelse med prokaryotiske verter, omfatter
20 PhoA-promotoren, β -galaktamase- og laktosepromotorsystemene (Chang et al., Nature, 275:615 (1978), Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)), alkalinfosfatase, et tryptofan(trp)promotorsystem (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36 776) og hybridpromotorer, slik som *tac*- (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)) eller *trc*-promotoren. Promotorer
25 til anvendelse i bakteriesystemer vil også inneholde en Shine-Dalgarno (S.D.)-sekvens operativt bundet til DNA-et som koder for anti-CD79b-antistoff. Men andre promotorer som er funksjonelle i bakterier (slik som andre kjente bakterie- eller fagpromotorer), er også egnet. Deres nukleotidsekvenser er publisert, hvilket gjør det mulig for en fagperson operativt å ligere dem til
30 cistroner som koder for utpekte lette og tunge kjeder (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) ved hjelp av linkere eller adaptorer for å tilføre alle nødvendige restriksjonssteder.

I et aspekt av oppfinnelsen omfatter hvert cistron i den rekombinante vektoren
35 en utskillingssignalsekvenskomponent som retter translokasjonen av de uttrykte polypeptidene over en membran. Signalsekvensen kan alminneligvis være en

komponent av vektoren, eller den kan være en del av det utpekte polypeptid-DNA-et som er innsatt i vektoren. Signalsekvensen som er valgt for formålet ifølge denne oppfinnelse, bør være en som gjenkjennes og behandles (dvs. spaltes av en signalpeptidase) av vertscellen. For prokaryotiske vertsceller som

5 ikke gjenkjenner og behandler signalsekvensene som forekommer naturlig i de heterologe polypeptidene, substitueres signalsekvensen med en prokaryotisk signalsekvens valgt for eksempel fra gruppen bestående av alkalisk fosfatase, penicillinase, Ipp eller varmestabile enterotoksin-II(STII)-ledere, LamB, PhoE, PelB, OmpA og MBP. I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen er signalsekvensen

10 anvendt i begge cistroner av ekspresjonssystemet STII-signalsekvenser eller varianter derav.

I et annet aspekt kan produksjonen av immunglobulinene ifølge oppfinnelsen forekomme i cytoplasmaet i vertscellen, og krever derfor ikke forekomst av

15 utskillingssignalsekvenser i hvert cistron. Med hensyn til dette uttrykkes, foldes og sammenstilles immunglobulinets lette og tunge kjeder for å danne funksjonelle immunglobuliner i cytoplasmaet. Visse vertsstammer (f.eks. *E. coli* *trxB*^{-stammene}) stiller til rådighet cytoplasmaforhold som er gunstige for disulfidbindingsdannelse, hvilket gir mulighet for riktig folding og sammenstilling

20 av uttrykte proteinunderenheter. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Den foreliggende oppfinnelse stiller til rådighet et ekspresjonssystem hvor det kvantitative forholdet av uttrykte polypeptidkomponenter kan moduleres for å maksimere utbyttet av utskilte og forskriftsmessig sammenstilte antistoffer ifølge

25 oppfinnelsen. Slik modulering oppnås minst delvis ved samtidig modulering av translasjonelle styrker for polypeptidkomponentene.

Én teknikk for modulering av translasjonell styrke er beskrevet i Simmons et al., US-patent nr. 5 840 523. Den anvender varianter av den translasjonelle

30 startregionen (TIR) i et cistron. For en bestemt TIR kan det dannes en serie aminosyre- eller nukleinsyresekvensvarianter med en rekke translasjonelle styrker, hvilket stiller til rådighet et praktisk middel hvorved denne faktoren justeres for den spesifikke kjedens ønskede ekspresjonsnivå. TIR-varianter kan dannes ved klassiske mutageneseteknikker som resulterer i kodonendringer som

35 kan endre aminosyresekvensen, selv om stille endringer i nukleotidsekvensen er foretrukket. Endringer i TIR kan omfatte for eksempel endringer i antallet eller

avstanden mellom Shine-Dalgarno-sekvenser, sammen med endringer i signalsekvensen. Én fremgangsmåte for dannelsen av mutante signalsekvenser er dannelsen av en "kodonbank" i begynnelsen av en kodingssekvens som ikke endrer signalsekvensens aminosyresekvens (dvs. endringene er stille). Dette kan

5 oppnås ved endring av den tredje nukleotidposisjonen av hvert kodon; noen aminosyrer, slik som leucin, serin og arginin, har i tillegg flere første og andre posisjoner som kan gjøre det mer komplekst å fremstille banken. Denne fremgangsmåten for mutagenese er beskrevet i detalj i Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151–158.

10

Et sett av vektorer dannes fortrinnsvis med et område av TIR-styrker for hvert cistron deri. Dette begrensede settet stiller til rådighet en sammenligning av ekspresjonsnivåer av hver kjede samt utbyttet av de ønskede antistoffproduktene under forskjellige TIR-styrkekombinasjoner. TIR-styrker kan

15 bestemmes ved kvantifisering av ekspresjonsnivået av et reportergen som beskrevet i detalj i Simmons et al. US-patent nr. 5 840 523. Basert på den translasjonelle styrkesammenligningen er de ønskede individuelle TIR-ene valgt for å kombineres i ekspresjonsvektorkonstruksjonene ifølge oppfinnelsen.

b. Eukaryotiske vertsceller

20

Vektorkomponentene omfatter vanligvis blant annet én eller flere av følgende: en signalsekvens, et replikasjonsorigin, én eller flere markørgener, et enhancerelement, en promotor og en transkripsjonstermineringssekvens.

1) Signalsekvenskomponent

25

En vektor for anvendelse i en eukaryotisk vertscelle kan også inneholde en signalsekvens eller et annet polypeptid med et spesifikt spaltingssted ved N-terminalen av det modne proteinet eller polypeptidet av interesse. Den valgte heterologe signalsekvens er fortrinnsvis en som er gjenkjent og behandlet (dvs.

30 spaltet av en signalpeptidase) av vertscellen. I pattedyrcelleekspresjon er pattedyrsignalsekvenser samt virale utskillingsledere, f.eks. herpes simplex-gD-signalet, tilgjengelige.

DNA-et for en slik forløperregion er ligert i leseramme til DNA som koder for antistoffet.

2) Replikasjonsorigin

- 5 Det er alminneligvis ikke behov for en replikasjonsoriginkomponent for pattedyrekspresjonsvektorer. SV40-originet kan typisk anvendes bare fordi det inneholder den tidlige promotoren.

3) Seleksjonsgenkomponent

- 10 Ekspresjons- og kloningsvektorene vil vanligvis inneholde et seleksjonsgen som også kalles en selektiv markør. Typiske seleksjonsgener koder for proteiner som a) tildeler resistens til antibiotika eller andre toksiner, f.eks. ampicillin, neomycin, metotreksat eller tetrasyklin, b) komplementerer auksotrofiske mangler eller c) leverer viktige næringsstoffer som ikke er tilgjengelige fra
- 15 komplekse medier, f.eks. genet som koder for D-alaninracemase til *Bacilli*.

- Et eksempel på et seleksjonsskjema anvender et legemiddel til å stanse veksten av en vertscelle. Disse cellene, som med hell omdannes med et heterologt gen, produserer et protein som tildeler legemiddelresistens og således overlever
- 20 seleksjonsregimet. Eksempler på slik dominerende seleksjon anvender legemidlene neomycin, mykofenolsyre og hygromycin.

- Et eksempel på egnede selektive markører for pattedyrceller er dem som gjør identifikasjonen av cellene i stand til å oppta den anti-CD79b-antistoff-kodende
- 25 nukleinsyren, slik som DHFR eller tymidinkinase, metallotionein-I og -II, fortrinnsvis primatmetallotioneingener, adenosindeaminase, ornitindekarboksylase osv. En egnet vertscelle når det anvendes villtype-DHFR, er CHO-cellelinje som er mangelfull i DHFR-aktivitet (f.eks. ATCC CRL-9096), fremstilt og spredt som beskrevet i Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
- 30 77:4216 (1980). Celler omdannet med DHFR-seleksjonsgenet identifiseres for eksempel først ved dyrking av alle transformantene i et kulturmedium som inneholder metotreksat (Mtx), en kompetitiv antagonist av DHFR. Vertsceller (særlig villtypeverter som inneholder endogent DHFR) som er omdannet eller ko-

omdannet med DNA-sekvenser som koder for et antistoff, villtype-DHFR-protein og en annen selektiv markør slik som aminoglykosid-3'-fosfotransferase (APH), kan eventuelt velges etter cellevekst i medium inneholdende et seleksjonsstoff for den selektive markør, slik som et aminoglykosidisk antibiotikum, f.eks.

5 kanamycin, neomycin eller G418. Se US-patent nr. 4 965 199.

Et egnet seleksjonsgen for anvendelse i gjær er *trp1*-genet som er til stede i gjærplasmidet YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)). *trp1*-genet stiller

10 til rådighet en seleksjonsmarkør for en mutant gjærstamme som mangler evnen til å vokse i tryptofan, f.eks. ATCC-nr. 44076 eller PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)).

4) Promotorkomponent

15 Ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder vanligvis en promotor som er operativt bundet til den anti-CD79b-antistoff-kodende nukleinsyresekvensen til direkte mRNA-syntese. Promotorer som er gjenkjent av en rekke potensielle vertsceller, er velkjent.

20 Praktisk talt alle eukaryotiske gener har en AT-rik region som er plassert ca. 25 til 30 baser oppstrøms fra det stedet hvor transkripsjon startes. En annen sekvens funnet 70 til 80 baser oppstrøms fra starten av transkripsjonen av mange gener er en CNCAAT-region hvor N kan være et hvilket som helst nukleotid. Ved 3'-enden av de fleste eukaryotiske gener er en AATAAA-sekvens

25 som kan være signalet for tilsetning av poly-A-halen til 3'-enden av kodingssekvensen. Alle disse sekvensene kan passende innsettes i eukaryotiske ekspresjonsvektorer.

Eksempler på egnede promotorsekvenser for anvendelse med gjærverter

30 omfatter promotorene for 3-fosfoglyceratkinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) eller andre glykolytiske enzymer (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)), slik som enolase, glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, heksokinase, pyruvatdekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfatisomerase, 3-fosfoglyceratmutase,

35 pyruvatkinase, triosefosfatisomerase, fosfoglukoseisomerase og glukokinase.

Andre gjærpromotorer, som er induserbare promotorer som har den ytterligere fordel at transkripsjon kontrolleres av vekstbetingelser, er promotorregionene for alkoholdehydrogenase 2, isocytokrom C, syrefosfatase, nedbrutte enzymer
 5 forbundet med nitrogenmetabolisme, metallotionein, glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase og enzymer som er ansvarlige for maltose- og galaktoseanvendelse. Egnede vektorer og promotorer for anvendelse i gjærekspresjon er ytterligere beskrevet i EP 73 657.

10 Anti-CD79b-antistofftranskripsjon fra vektorer i pattedyrvertsceller kontrolleres for eksempel av promotorer oppnådd fra genomene av viruser slik som polyomvirus, fjærkrekkoppvirus (UK 2 211 504 publisert 5. juli 1989), adenovirus (slik som adenovirus 2), bovint papillomvirus, aviært sarkomvirus, cytomegalovirus, et retrovirus, hepatitt-B-virus og simianvirus 40 (SV40), fra
 15 heterologe pattedyrpromotorer, f.eks. aktinpromotoren eller en immunglobulinpromotor, og fra varmesjokkpromotorer, forutsatt at slike promotorer er forenlige med vertscellesystemene.

De tidlige og sene promotorene av SV40-viruset kan passende oppnås som et
 20 SV40-restriksjonsfragment som også inneholder det SV40-virale replikasjonsoriginet. Den umiddelbare tidlige promotoren av det humane cytomegaloviruset oppnås passende som et HindIII E-restriksjonsfragment. Et system for ekspresjon av DNA i pattedyrverter ved hjelp av det bovine papillomviruset som en vektor er beskrevet i US-patent nr. 4 419 446. En
 25 modifikasjon av dette systemet er beskrevet i US-patent nr. 4 601 978. Se også Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) om ekspresjon av humant β -interferon-cDNA i museceller under kontroll av en tymidinkinasepromotor fra herpes simplex-virus. Den lange terminale gjentakelsen fra rous-sarkom-virus kan eventuelt anvendes som promotor.

30 **5) Enhancerelementkomponent**

Transkripsjon av et DNA som koder for anti-CD79b-antistoff med høyere eukaryoter, kan økes ved å innsette en enhancersekvens i vektoren. Enhancere er cis-virkende elementer av DNA, vanligvis ca. fra 10 til 300 bp, som virker på
 35 en promotor for å øke dens transkripsjon. Mange enhancersekvenser er nå kjent

fra pattedyrgener (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein og insulin). Typisk vil det imidlertid bli anvendt en enhancer fra et eukaryotisk cellevirus. Eksempler omfatter SV40-enhanceren på den sene siden av replikasjonsoriginet (bp 100–270), den tidligere cytomegaloviruspromotorenhanceren, polyomenhanceren på 5 den sene siden av replikasjonsoriginet og adenovirusenhancere. Se også Yaniv, Nature 297:17–18 (1982) om forsterkende elementer for aktivering av eukaryotiske promotorer. Enhanceren kan spleises inn i vektoren ved posisjon 5' eller 3' til den anti-CD79b-antistoff-kodende sekvensen, men er fortrinnsvis plassert på et sted 5' fra promotoren.

10 **6) Transkripsjonstermineringskomponent**

Ekspresjonsvektorer som anvendes i eukaryotiske vertsceller (gjær-, sopp-, insekts-, plante-, dyre- eller menneskeceller eller nukleære celler fra andre flercellede organismer), vil også inneholde sekvenser som er nødvendige for 15 terminering av transkripsjon og stabilisering av mRNA-et. Slike sekvenser er vanligvis tilgjengelige fra 5' og leilighetsvis 3' utranslaterte regioner av eukaryotiske eller virale DNA-er eller cDNA-er. Disse regionene inneholder nukleotidsegmenter som er transkribert som polyadenylerte fragmenter i den utranslaterte delen av mRNA-et som koder for anti-CD79b-antistoff. En nyttig 20 transkripsjonstermineringskomponent er den bovine veksthormonspolyadenyleringsregion. Se WO94/11026 og ekspresjonsvektoren beskrevet deri.

Enda andre fremgangsmåter, vektorer og vertsceller som er egnet til adaptasjon 25 til syntesen av anti-CD79b-antistoff i rekombinant cellekultur fra virveldyr, er beskrevet i Gething et al., Nature, 293:620–625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40–46 (1979); EP 117 060; og EP 117 058.

4. Dyrking av vertscellene

30 Vertscellene som anvendes til å produsere anti-CD79b-antistoffet ifølge denne oppfinnelse, kan dyrkes i en rekke medier.

a. Prokaryotiske vertsceller

Prokaryotiske celler anvendt til å produsere polypeptidene ifølge oppfinnelsen dyrkes i medium som er kjent i teknikken og egnet for dyrking av de valgte vertscellene. Eksempler på egnet medium omfatter luria broth (LB) pluss
5 nødvendige næringsstoffsupplementer. I noen utførelsesformer inneholder også mediet et seleksjonsstoff, valgt basert på konstruksjonen av ekspresjonsvektoren, for selektivt å tillate vekst av prokaryotiske celler inneholdende ekspresjonsvektoren. Ampicillin tilsettes for eksempel til medium for vekst av celler som uttrykker ampicillinresistent gen.

10

Alle nødvendige supplementer foruten karbon, nitrogen og uorganiske fosfatkilder kan også omfattes ved egnede konsentrasjoner tilført alene eller som en blanding med et annet supplement eller medium, slik som en kompleks nitrogenkilde. Kulturmediet kan eventuelt inneholde ett eller flere
15 reduksjonsstoffer valgt fra gruppen bestående av glutation, cystein, cystamin, tioglykollat, ditioerytritol og ditiotreitol.

De prokaryotiske vertscellene dyrkes ved egnede temperaturer. For *E. coli*-vekst er for eksempel den foretrukne temperaturen fra ca. 20 °C til ca. 39 °C, mer foretrukket fra ca. 25 °C til ca. 37 °C, enda mer foretrukket ved ca. 30 °C. pH-en for mediet kan være alle pH-er fra ca. 5 til ca. 9, hovedsakelig avhengig av vertsorganismen. For *E. coli* er pH-en fortrinnsvis fra ca. 6,8 til ca. 7,4, og mer foretrukket ca. 7,0.

25 Hvis en inducibel promotor anvendes i ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen, induseres proteinekspresjonen under betingelser som egner seg for aktivering av promotoren. I et aspekt ifølge oppfinnelsen anvendes PhoA-promotorer for å kontrollere transkripsjon av polypeptidene. De omdannede vertscellene dyrkes således i et fosfatbegrensende medium for induksjon. Det fosfatbegrensende
30 mediet er fortrinnsvis C.R.A.P-mediet (se for eksempel Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133–147). En rekke andre indukere kan anvendes, ifølge vektorkonstruksjonen anvendt, som er kjent i teknikken.

I en utførelsesform utskilles og utvinnes de uttrykte polypeptidene ifølge den
35 foreliggende oppfinnelse fra periplasmaet av vertscellene. Proteinutvinning involverer vanligvis forstyrrelse av mikroorganismen, vanligvis ved hjelp av

osmotisk sjokk, sonikasjon eller lysering. Når cellene forstyrres, kan cellerester eller hele celler fjernes ved sentrifugering eller filtrering. Proteinene kan renses ytterligere for eksempel ved hjelp av affinitetsharpijskromatografi. Proteiner kan eventuelt transporteres inn i kulturmediet og isoleres deri. Celler kan fjernes fra

5 kulturen og kultursupernatantet som filtreres, og konsentreres for videre rensing av de fremstilte proteinene. De uttrykte polypeptidene kan videre isoleres og identifiseres ved hjelp av alminnelig kjente fremgangsmåter, slik som polyakrylamidgelelektroforese (PAGE) og Western Blotting-assay.

- 10 I et aspekt av oppfinnelsen utføres antistoffproduksjon i store mengder ved hjelp av en gjæringsprosess. Forskjellige fed-batch-gjæringsprosedyrer i stor skala er tilgjengelige for produksjon av rekombinante proteiner. Gjæring i stor skala har minst 1000 liters kapasitet, fortrinnsvis ca. 1000 til 100 000 liters kapasitet. Disse gjæringsstoffene anvender røreverk til å fordele oksygen og
- 15 næringsmidler, spesielt glukose (den foretrukne karbon-/energikilde). Med gjæring i liten skala menes vanligvis gjæring i en gjæringstank som ikke har mer enn ca. 100 liters volumkapasitet, og kan ha fra ca. 1 liter til ca. 100 liter.

- I en gjæringsprosess initieres typisk induksjon av proteinekspresjon etter at
- 20 cellene er dyrket under egnede forhold til en ønsket tetthet, f.eks. en OD₅₅₀ på ca. 180–220, hvor cellene er i den tidlige stasjonære fasen. En rekke indukere kan anvendes, ifølge den anvendte vektorkonstruksjonen, som er kjent i teknikken og beskrevet ovenfor. Celler kan dyrkes over korte perioder før induksjon. Celler induseres vanligvis i ca. 12–50 timer, selv om lengre og kortere
- 25 induksjonstid kan anvendes.

- For å forbedre produksjonsutbyttet og kvaliteten på polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan forskjellige gjæringsforhold modifiseres. For å forbedre riktig sammenstilling og folding av de utskilte antistoffpolypeptidene kan ytterligere
- 30 vektorer som overuttrykker foldehjelpere, slik som Dsb-proteiner (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD og/eller DsbG) eller FkpA (et peptidylprolyl-cis, transisomerase med foldehjelperaktivitet) for eksempel anvendes til samtidig å omdanne de prokaryotiske vertscellene. Foldehjelperne er påvist å lette riktig folding og løselighet for heterologe proteiner fremstilt i bakterielle vertsceller. Chen et al.
- 35 (1999) J Bio Chem 274:19601–19605; Georgiou et al., US-patent nr. 6 083 715; Georgiou et al., US-patent nr. 6 027 888; Bothmann og Pluckthun (2000) J. Biol.

Chem. 275:17100-17105; Ramm og Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

- For å begrense proteolyse av uttrykte heterologe proteiner (spesielt dem som er proteolytisk sensitive), kan visse vertsstammer som mangler proteolytiske enzymer, anvendes ifølge den foreliggende oppfinnelse. Vertscellestammer kan for eksempel modifiseres for å påvirke genetiske mutasjoner i genene som koder for kjente bakterieproteaser, slik som protease III, OmpT, DegP, Tsp, protease I, protease Mi, protease V, protease VI og kombinasjoner derav. Noen *E. coli*-proteasemanglende stammer er tilgjengelige og beskrevet i for eksempel Joly et al. (1998) *ovenfor*; Georgiou et al., US-patent nr. 5 264 365; Georgiou et al., US-patent nr. 5 508 192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).
- I en utførelsesform anvendes *E. coli*-stammer som mangler proteolytiske enzymer, og omdannes med plasmider som overuttrykker én eller flere foldehjelpere som vertsceller i ekspresjonssystemet ifølge oppfinnelsen.

b. Eukaryotiske vertsceller

- Kommersielt tilgjengelig medium, slik som Hams F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) og Dulbeccos modifiserte Eagles medium ((DMEM), Sigma) er egnet for dyrking av vertscellene. Alle mediene beskrevet i Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), US-patent nr. 4 767 704, 4 657 866, 4 927 762, 4 560 655 eller 5 122 469, WO 90/03430, WO 87/00195 eller US-patent nr. 30 985 kan i tillegg anvendes som kulturmedium for vertscellene. Alle disse mediene kan være supplert etter behov med hormoner og/eller andre vekstfaktorer (slik som insulin-, transferrin- eller epidermalvekstfaktor), salter (slik som natriumklorid, kalsium, magnesium og fosfat), buffere (slik som HEPES), nukleotider (slik som adenosin og tymidin), antibiotika (slik som GENTAMYCIN™-legemiddel), sporelementer (definert som uorganiske forbindelser som vanligvis finnes ved sluttkonsentrasjoner i det mikromolare området) og glukose eller en tilsvarende energikilde. Alle andre nødvendige supplementer kan også være omfattet ved egnede konsentrasjoner som vil være kjent for fagpersoner. Dyrkingsforholdene, slik som temperatur, pH og lignende,

er dem som er tidligere anvendt med vertscellen valgt for ekspresjon og vil være åpenbare for fagpersoner.

5. Påvisning av genamplifikasjon/-ekspresjon

5 Genamplifikasjon og/eller -ekspresjon kan måles i en prøve direkte for eksempel ved klassisk Southern Blotting, Northern Blotting for å kvantitere transkripsjonen av mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201–5205 (1980)), dot blotting (DNA-analyse) eller hybridisering *in situ* ved anvendelse av en riktig merket sonde, basert på sekvensene stilt til rådighet heri. Antistoffer som kan
10 gjenkjenne spesifikke duplekser, kan eventuelt anvendes, herunder DNA-duplekser, RNA-duplekser og DNA-RNA-hybridduplekser eller DNA-proteinduplekser. Antistoffene kan på sin side merkes, og assayet kan utføres når duplekset er bundet til en overflate, slik at ved dannelsen av dupleks på overflaten vil forekomst av antistoffet bundet til duplekset påvises.

15 Genekspresjon kan eventuelt måles ved hjelp av immunologiske fremgangsmåter, slik som immunhistokjemisk farging av celler eller vevssnitt og assay av cellekultur eller kroppsvæsker, for å kvantitere direkte ekspresjonen av genproduktet. Antistoffer som er nyttige for immunhistokjemisk farging og/eller
20 assay av prøvefluider, kan være enten monoklonale eller polyklonale, og kan fremstilles hos alle pattedyr. Antistoffene kan enkelt fremstilles mot et CD79b-polypeptid med naturlig forekommende sekvens eller mot et syntetisk peptid basert på DNA-sekvensene stilt til rådighet heri eller mot eksogen sekvens fusjonert til CD79b-DNA og som koder for en spesifikk antistoffepitop.

6. Rensing av anti-CD79b-antistoff

Former av anti-CD79b-antistoff kan utvinnes fra kulturmedium eller fra vertscellelysater. Hvis det er membranbundet, kan det frisettes fra membranen ved hjelp av en egnet vaskemiddelløsning (f.eks. Triton-X 100) eller ved
30 enzymatisk spalting. Celler anvendt til ekspresjon av anti-CD79b-antistoff kan forstyrres ved hjelp av forskjellige fysiske eller kjemiske midler, slik som en fryse-/tinesyklus, sonikasjon, mekanisk forstyrrelse eller cellelyserende stoffer.

- Det kan være ønsket å rense anti-CD79b-antistoff fra rekombinante celleproteiner eller polypeptider. Følgende prosedyrer er eksempler på egnede renseprosedyrer: ved fraksjonering på en ionbyttekolonne, etanolutfelling, HPLC med omvendt fase, kromatografi på silika eller på en kationbytteharpiks slik som
- 5 DEAE, kromatofokusering, SDS-PAGE, ammoniumsulfatutfelling, gelfiltrering ved hjelp av for eksempel Sephadex G-75, protein A-Sepharose-kolonner for å fjerne urenheter slik som IgG og chelaterende metallkolonner for å binde epitopmerkede former av anti-CD79b-antistoffet. Forskjellige fremgangsmåter for proteinrensing kan anvendes, og slike fremgangsmåter er kjent i teknikken
- 10 og beskrevet for eksempel i Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990), Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). De valgte rensetrinnene vil for eksempel avhenge av arten av den anvendte produksjonsprosessen og det særlig fremstilte -CD79b-antistoffet.
- 15 Når det anvendes rekombinante teknikker, kan antistoffet produseres intracellulært, i det periplasmiske rom eller utskilles direkte i mediet. Hvis antistoffet produseres intracellulært, fjernes partikkelrestene, enten vertsceller eller lyserte fragmenter, som et første trinn, f.eks. ved sentrifugering eller ultrafiltrering. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163–167 (1992) beskriver en prosedyre for isolering av antistoffer som utskilles til det periplasmiske rom av *E. coli*. Cellepasta tines kort fortalt ved forekomst av natriumacetat (pH 3,5), EDTA og fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) over ca. 30 min. Celleenheter kan fjernes ved sentrifugering. Når antistoffet utskilles i mediet, konsentreres supernatanter fra slike ekspresjonssystemer alminneligvis først ved hjelp av et kommersielt
- 20 tilgjengelig proteinkonsentrasjonsfilter, f.eks. et Amicon- eller Millipore Pellicon-ultrafiltreringsapparat. En proteaseinhiberer slik som PMSF kan være omfattet i hvilke som helst av de foregående trinn for å inhibere proteolyse, og antibiotika kan omfattes for å forhindre veksten av adventive urenheter.
- 25 Antistoffsammensetningen fremstilt fra cellene kan renses ved hjelp av for eksempel hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse og affinitetskromatografi, hvor affinitetskromatografi er den foretrukne renseteknikken. Anvendeligheten av protein A som en affinitetsligand avhenger av artene og isotypen av eventuelt immunoglobulin Fc-domene som er til stede i
- 30 antistoffet. Protein A kan anvendes til å rense antistoffer som er basert på humane $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - eller $\gamma 4$ -tungkjeder (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1–

- 13 (1983)). Protein G anbefales for alle museisotyper og for human $\gamma 3$ (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Matrisen hvortil affinitetsliganden er bundet, er oftest agarose, men andre matriser er tilgjengelige. Mekanisk stabile matriser, slik som kontrollert poreglass eller poly(styrendivinyll)benzen, gir mulighet for hurtigere strømningshastigheter og kortere behandlingstider enn det som kan oppnås med agarose. Når antistoffet omfatter et C_H3 -domene, er Bakerbond ABXTM-harpiksen (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) nyttig for rensing. Andre teknikker for proteinrensing slik som fraksjonering på en ionbyttekolonne, etanolutfelling, HPLC med omvendt fase, kromatografi på silika, kromatografi på heparin, SEPHAROSETM-kromatografi på et anion- eller kationbytteharpiks (slik som en polyasparaginsyrekolonne), kromatofokusering, SDS-PAGE og ammoniumsulfatutfelling er også tilgjengelig avhengig av antistoffet som skal utvinnes.
- 15 Etter eventuelle innledende rensetrinn kan blandingen omfattende antistoffet av interesse og urenheter underkastes hydrofob vekselvirkningskromatografi med lav pH ved hjelp av en elueringsbuffer ved en pH mellom ca. 2,5 og 4,5, fortrinnsvis utført ved lave saltkonsentrasjoner (f.eks. fra ca. 0 til 0,25 M salt).

G. Farmasøytiske formuleringer

20

Antistofflegemiddelkonjugatene (ADC) ifølge oppfinnelsen kan tilføres gjennom enhver rute som er egnet for tilstanden som skal behandles. ADC-et vil vanligvis tilføres parenteralt, dvs. ved infusjon, subkutan, intramuskulært, intravenøst, intradermalt, intratektalt og epiduralt.

25

For å behandle disse krefttypene tilføres i en utførelsesform antistofflegemiddelkonjugatet via intravenøs infusjon. Dosen tilført via infusjon er fra ca. 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 10 000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ per dose, vanligvis én dose per uke for en sum på én, to, tre eller fire doser. Doseområdet er eventuelt fra ca. 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, ca. 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, ca. 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, ca. 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, ca. 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, ca. 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, ca. 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ og ca. 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. Dosen kan tilføres én gang per dag, én gang per uke, flere ganger per uke, men mindre enn én gang per dag, flere ganger per måned, men mindre enn én gang per dag, flere ganger per måned, men mindre enn én gang per uke, én gang per

35

måned eller intermitterende for å lindre eller lette symptomene på sykdommen. Tilførsel kan fortsette ved ethvert av de beskrevne intervallene helt til remisjon av tumoren eller symptomene på lymfomet, leukemien som behandles, er oppnådd. Tilførsel kan fortsette etter remisjon eller lindring av symptomene er oppnådd, når slik remisjon eller lindring forlenges ved slik fortsatt tilførsel.

Oppfinnelsen stiller også til rådighet en fremgangsmåte for lindring av en autoimmun sykdom, omfattende tilførsel til en pasient som lider av den autoimmune sykdommen, av en terapeutisk virkningsfull mengde av et humanisert MA79b-antistofflegemiddelkonjugat ifølge alle de foregående utførelsesformene. I foretrukne utførelsesformer tilføres antistoffet intravenøst eller subkutant. Antistofflegemiddelkonjugatet tilføres intravenøst med en dose i området fra ca. $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ per dose, og i en spesifikk utførelsesform er dosen fra $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$. Dosen kan tilføres én gang per dag, én gang per uke, flere ganger per uke, men mindre enn én gang per dag, flere ganger per måned, men mindre enn én gang per dag, flere ganger per måned, men mindre enn én gang per uke, én gang per måned eller intermitterende for å lindre eller lette symptomene på sykdommen. Tilførsel kan fortsette ved hvilke som helst av de beskrevne intervallene til lettelse fra eller lindring av symptomer på den autoimmune sykdommen som blir behandlet, er oppnådd. Tilførsel kan fortsette etter at lettelse fra eller lindring av symptomer oppnås, hvor slik lindring eller lettelse forlenges ved slik fortsatt tilførsel.

Oppfinnelsen stiller også til rådighet en fremgangsmåte for behandling av en B-celleforstyrrelse omfattende tilførsel til en pasient med en B-celleforstyrrelse, slik som en B-celleproliferativ forstyrrelse (omfattende blant annet lymfom og leukemi) eller en autoimmun sykdom, en terapeutisk virkningsfull mengde av et humanisert MA79b antistoff av en hvilken som helst av foregående utførelsesformer, hvilket antistoff ikke er konjugert til et cytotoxisk molekyl eller et påvisbart molekyl. Antistoffet vil vanligvis tilføres i et doseområde fra ca. $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ til ca. $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$.

I et aspekt stiller oppfinnelsen videre til rådighet farmasøytiske formuleringer omfattende minst ett anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen og/eller minst ett immunkonjugat derav og/eller minst ett anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugat ifølge oppfinnelsen. I noen utførelsesformer omfatter en farmasøytisk

formulering 1) et antistoff ifølge oppfinnelsen og/eller et immunkonjugat derav og 2) et farmasøytisk akseptabelt bærestoff. I noen utførelsesformer omfatter en farmasøytisk formulering 1) et antistoff ifølge oppfinnelsen og/eller et immunkonjugat derav, og eventuelt 2) minst ett ytterligere terapeutisk stoff.

- 5 Ytterligere terapeutiske stoffer omfatter blant annet dem beskrevet nedenfor. ADC-et vil vanligvis tilføres parenteralt, dvs. ved infusjon, subkutan, intramuskulært, intravenøst, intradermalt, intratekalt og epiduralt.

- 10 Terapeutiske formuleringer omfattende et anti-CD79b-antistoff eller CD79b-immunkonjugat anvendt i samsvar med den foreliggende oppfinnelse er fremstilt for oppbevaring ved blanding av antistoffet eller immunkonjugatet med den ønskede graden av renhet med valgfrie farmasøytisk akseptable bærestoffer, hjelpestoffer eller stabiliseringsmidler (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), i form av frysetørkede formuleringer eller
- 15 vandige løsninger. Akseptable bærestoffer, hjelpestoffer eller stabiliseringsmidler er ikke-toksiske for mottagere ved de anvendte dosene og konsentrasjonene, og omfatter buffere slik som acetat, Tris, fosfat, citrat og andre organiske syrer, antioksidanter omfattende askorbinsyre og metionin, konserveringsmidler (slik som
- 20 oktaedecyldimetylbenzylammoniumklorid, heksametoniumklorid, benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, fenol-, butyl- eller benzylalkohol, alkylparabener slik som metyl- eller propylparaben, katekol, resorcinol, sykloheksanol, 3-pentanol og m-kresol), polypeptider med lav molekylvekt (mindre enn ca. 10 enheter), proteiner, slik som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner, hydrofile polymerer slik som polyvinylpyrrolidon, aminosyrer
- 25 slik som glycin, glutamin, asparagin, histidin, arginin eller lysin, monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater omfattende glukose, mannose eller dekstriner, chelaterende stoffer slik som EDTA, helsestimulerende stoffer slik som trehalose og natriumklorid, sukre slik som sukrose, mannitol, trehalose eller sorbitol, surfaktant slik som polysorbat, saltdannende motioner slik som natrium,
- 30 metallkomplekser (f.eks. Zn-proteinkomplekser) og/eller ikke-ioniske surfaktanter slik som TWEEN®, PLURONICS® eller polyetylglykol (PEG). Farmasøytiske formuleringer som skal anvendes til tilførsel *in vivo*, er vanligvis sterile. Dette oppnås enkelt ved filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner.
- 35 Formuleringene heri kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse som nødvendig for den bestemte indikasjon som blir behandlet, fortrinnsvis dem med

komplementære aktiviteter som ikke virker negativt på hverandre. I tillegg til et anti-CD79b-antistoff kan det for eksempel være ønskelig å omfatte i den ene formuleringen et ytterligere antistoff, f.eks. et andre anti-CD79b-antistoff som binder en annen epitop på CD79b-polypeptidet, eller et antistoff til et annet mål

5 slik som en vekstfaktor som påvirker veksten av den særlige krefttypen. Sammensetningen kan videre eventuelt eller i tillegg omfatte et kjemoterapeutisk stoff, et cytotoxisk stoff, et cytokin, et vekstinhiberende stoff, et antihormonstoff og/eller et hjertebeskyttelsesstoff. Slike molekyler er passende til stede i kombinasjon i mengder som er virkningsfulle for det tiltenkte

10 formålet.

Virkestoffene kan også være innfanget i mikrokapsler som er fremstilt for eksempel ved koacerveringsteknikker eller ved fasegrensepolymerisering, f.eks. henholdsvis hydroksymetylcellulose eller gelatinmikrokapsler og poly-

15 (metylmetacrylat)mikrokapsler, i kolloidale legemiddeltilførselssystemer (f.eks. liposomer, albuminmikrosfærer, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

20 Fremstillinger for forsinket frisetting kan fremstilles. Egnede eksempler på fremstillinger for forsinket frisetting omfatter semipermeable matriser av faste hydrofobe polymerer inneholdende antistoffet, hvilke matriser er i form av formede artikler, f.eks. filmer eller mikrokapsler. Eksempler på matriser for forsinket frisetting omfatter polyestere, hydrogeler (f.eks. poly(2-hydroksyetyl-

25 metakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (US-patent. nr. 3 773 919), kopolymerer av L-glutaminsyre og γ -etyl-L-glutamat, ikke-nedbrytbart etylen-vinylacetat, nedbrytbare melkesyre-glykolsyrekopolymerer slik som LUPRON DEPOT® (injiserbare mikrosfærer sammensatt av melkesyre-glykolsyrekopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre.

30 Mens polymerer slik som etylen-vinylacetat og melkesyre-glykolsyre gir mulighet for frisetting av molekyler i over 100 dager, frisetter visse hydrogeler proteiner i kortere tidsperioder. Når kapslede immunglobuliner forblir i kroppen i lengre tid, kan de denaturere eller aggregere som et resultat av eksponering for fuktighet ved 37 °C, hvilket resulterer i et tap av biologisk aktivitet og mulige endringer i

35 immungenisitet. Det kan utarbeides rasjonelle strategier for stabilisering avhengig av den involverte mekanismen. Hvis aggregeringsmekanismen påvises

å være intermolekylær S-S-bindingsdannelse gjennom tiodisulfidbytte, kan stabilisering for eksempel oppnås ved modifikasjon av sulfhydrylenheter, frysetørking fra sure løsninger, kontroll av fuktighetsinnhold, bruk av egnede tilsetningsstoffer og utvikling av spesifikke polymermatrisesammensetninger.

5

Et antistoff kan formuleres i enhver egnet form for tilførsel til en målcelle / et målvev. Antistoffer kan for eksempel formuleres som immuliposomer. Et "liposom" er en liten vesikkel sammensatt av forskjellige typer lipider, fosfolipider og/eller surfaktanter som er nyttige for tilførsel av et legemiddel til et pattedyr. Liposomets komponenter er vanligvis ordnet i en tosjiktsformasjon lik lipidarrangementet av biologiske membraner. Liposomer inneholdende antistoffet fremstilles ved fremgangsmåter som er kjent i teknikken, slik som beskrevet i Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); US-patent nr. 4 485 045 og 4 544 545 og WO97/38731 publisert 23. oktober 1997. Liposomer med forbedret sirkuleringstid er beskrevet i US-patent nr. 5 013 556.

10

15

20

25

Særlig nyttige liposomer kan dannes ved fremgangsmåten for fordamping med omvendt fase med en lipidsammensetning omfattende fosfatidylkolin, kolesterol og PEG-avledende fosfalidyletanolamin (PEG-PE). Liposomer ekstruderes gjennom filtre med definert porestørrelse for å gi liposomer med ønsket diameter. Fab'-fragmenter av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan konjugeres til liposomene som beskrevet i Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) via en disulfidutvekslingsreaksjon. Et kjemoterapeutisk stoff finnes eventuelt i liposomet. Se Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

Formuleringene som skal anvendes til tilførsel *in vivo*, må være sterile. Dette oppnås enkelt ved filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner.

30

H. Behandling med anti-CD79b-antistoffer

For å bestemme CD79b-ekspresjon i kreften er forskjellige påvisningsassayer tilgjengelige. I en utførelsesform kan CD79b-polypeptidoverekspresjon analyseres ved immunhistokjemi (IHC). Parafininnebygde vevssnitt fra en

tumorbiopsi kan underkastes IHC-assayet og tildeles et CD79b-proteinfargeintensitetskriterium på følgende måte:

5 Score 0 – ingen farging observeres, eller membranfarging observeres i mindre enn 10 % av tumorcellene.

Score 1+ – en svakt / nesten umerkelig membranfarging påvises i mer enn 10 % av tumorcellene. Cellene farges bare i deler av sin membran.

10 Score 2+ – en svak til moderat komplett membranfarging observeres i mer enn 10 % av tumorcellene.

Score 3+ – en moderat til sterk komplett membranfarging observeres i mer enn 10 % av tumorcellene.

15

Disse tumorene med score på 0 eller 1+ for CD79b-polypeptid ekspresjon kan være karakterisert som ikke-overuttrykkende CD79b, mens disse tumorene med score på 2+ eller 3+ kan være karakterisert som overuttrykkende CD79b.

20 FISH-analyser slik som INFORM® (solgt av Ventana, Arizona) eller PATHVISION® (Vysis, Illinois) kan eventuelt eller i tillegg utføres på formalinfiksert, parafininnebygd tumorvev for å bestemme omfanget (eventuelt) av CD79b-overekspresjon i tumoren.

25 CD79b-overekspresjon eller -amplifikasjon kan evalueres ved hjelp av et assay for påvisning *in vivo*, f.eks. ved tilførsel av et molekyl (slik som et antistoff) som binder molekylet som skal påvises, og merkes med en påvisbar markør (f.eks. en radioaktiv isotop eller en fluorescerende markør) og skanne pasienten eksternt for lokalisering av markøren.

30

Som beskrevet ovenfor har anti-CD79b-antistoffene ifølge oppfinnelsen forskjellige ikke-terapeutiske anvendelser. Anti-CD79b-antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan være nyttig for stadieinndeling av CD79b-polypeptiduttrykkende kreft (f.eks. i radiobildedagnostikk). Antistoffene er også
35 nyttige for rensing eller immunutskilling av CD79b-polypeptid fra celler, for påvisning og kvantitering av CD79b-polypeptid *in vitro*, f.eks. i en ELISA eller

Western Blotting, for å drepe og eliminere CD79b-uttrykkende celler fra en populasjon av blandede celler som et trinn i rensingen av andre celler.

Avhengig av kreftens stadium omfatter kreftbehandling for øyeblikket én eller en
5 kombinasjon av følgende behandlinger: kirurgi for å fjerne det kreftfremkallende vevet, strålingsterapi og kjemoterapi. Anti-CD79b-antistoffbehandling kan være spesielt ønskelig hos eldre pasienter som ikke tolererer toksisiteten og bivirkningene ved kjemoterapi vel og ved metastatisk sykdom hvor strålingsterapi har begrenset nytte. De tumorutpekende anti-CD79b-antistoffene
10 ifølge oppfinnelsen er nyttige for å lindre CD79b-uttrykkende kreft ved innledende diagnostisering av sykdommen eller ved tilbakefall. For terapeutiske anvendelser kan anti-CD79b-antistoffet anvendes alene, eller i kombinasjonsbehandling med for eksempel hormoner, antiangiogener eller radiomerkede forbindelser eller med kirurgi, kryoterapi og/eller radioterapi. Anti-
15 CD79b-antistoffbehandling kan tilføres i kombinasjon med andre former for klassisk behandling, enten samtidig med, før eller etter klassisk behandling. Kjemoterapeutiske legemidler slik som TAXOTERE® (docetaksel), TAXOL® (paliktaksel), estramustin og mitoksantron anvendes til behandling av kreft, særlig hos pasienter med god risiko. I den foreliggende fremgangsmåte ifølge
20 oppfinnelsen for behandling av eller lindring av kreft kan kreftpasienten få tilført anti-CD79b-antistoff i kombinasjon med behandling med det ene eller flere av de foregående kjemoterapeutiske stoffene. Kombinasjonsbehandling med paliktaksel og modifiserte derivater (se for eksempel EP0600517) er særlig tenkt. Anti-CD79b-antistoffet vil bli tilført med en terapeutisk virkningsfull dose
25 av det kjemoterapeutiske stoffet. I en annen utførelsesform tilføres anti-CD79b-antistoffet i kombinasjon med kjemoterapi for å forsterke det kjemoterapeutiske stoffets aktivitet og virkning, f.eks. paklitaksel. Physicians' Desk Reference (PDR) beskriver doser av disse stoffene som anvendes til behandling av forskjellige krefttyper. Doseregimet og dosene av disse ovennevnte kjemoterapeutiske
30 legemidlene som er terapeutisk virkningsfulle, vil avhenge av den særlige krefttypen som blir behandlet, omfanget av sykdommen og andre faktorer som er kjent for fagpersonen, og som kan bestemmes av legen.

I en særlig utførelsesform tilføres et konjugat omfattende et anti-CD79b-antistoff
35 konjugert med et cytotoksisk stoff til pasienten. Immunkonjugatet bundet til CD79b-proteinet er fortrinnsvis internalisert av cellen, hvilket resulterer i økt

terapeutisk virkning av immunkonjugatet ved drepning av kreftcellen hvortil det binder. I en foretrukket utførelsesform utpeker eller forstyrrer det cytotoksiske stoffet nukleinsyren i kreftcellen. Eksempler på slike cytotoksiske stoffer er beskrevet ovenfor og omfatter maytansinoider, kalicheamiciner, ribonukleaser og
5 DNA-endonukleaser.

Anti-CD79b-antistoffene eller toksinkonjugater derav tilføres til en human pasient i samsvar med kjente fremgangsmåter, slik som intravenøs tilførsel, f.eks. som en bolus eller ved kontinuerlig infusjon over en tidsperiode, ved
10 intramuskulære, intraperitoneale, intracerebrospinale, subkutane, intraartikulære, intrasynoviale, intratekale, orale eller lokale ruter eller inhaleringsruter. Intravenøs eller subkutan tilførsel av antistoffet foretrekkes.

Andre terapeutiske regimer kan kombineres med tilførsel av anti-CD79b-
15 antistoffet. Den kombinerte tilførselen omfatter samtidig tilførsel ved hjelp av separate formuleringer eller en enkelt farmasøytisk formulering, og sammenhengende tilførsel i vilkårlig rekkefølge, hvor det fortrinnsvis er et tidsrom hvor begge (eller alle) virkestoffene viser sin biologiske aktivitet samtidig. Slik kombinert behandling resulterer fortrinnsvis i en synergistisk
20 terapeutisk virkning.

Det kan også være ønskelig å kombinere tilførsel av anti-CD79b-antistoffet eller antistoffer med tilførsel av et antistoff rettet mot et annet tumorantigen assosiert med den særlige kreftformen.

25

I en annen utførelsesform omfatter de terapeutiske behandlingsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelse kombinert tilførsel av et anti-CD79b-antistoff (eller antistoffer), og én eller flere kjemoterapeutiske stoffer eller vekstinhiberende stoffer, herunder samtidig tilførsel av cocktailer av forskjellige kjemoterapeutiske
30 stoffer, eller andre cytotoksiske stoffer eller andre terapeutiske stoffer som også inhiberer tumorvekst. Kjemoterapeutiske stoffer omfatter estramustinfosfat, prednimustin, cisplatin, 5-fluoruracil, melfalan, syklofosamid, hydroksyurea og hydroksyureataksaner (slik som paklitaksel og doksetaksel) og/eller antracyklinantibiotika. Fremstilling og doseplaner for slike kjemoterapeutiske
35 stoffer kan anvendes ifølge produsentens anvisninger eller som bestemt empirisk av fagpersonen. Fremstilling og doseplaner for slik kjemoterapi er også

beskrevet i Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). Antistoffet kan kombineres med en antihormonforbindelse, f.eks. en antiøstrogenforbindelse slik som tamoksifen, et antiprogesteron slik som onapriston (se EP 616 812) eller et antiandrogen slik som flutamid i doser som er kjent for slike molekyler. Når kreften som skal behandles, er androgenuavhengig kreft, kan pasienten tidligere ha vært underkastet antiandrogenbehandling, og etter at kreften er blitt androgenuavhengig, kan anti-CD79b-antistoffet (og eventuelt andre stoffer som beskrevet heri) tilføres til pasienten.

10

Det kan leilighetsvis være gunstig også samtidig å tilføre et hjertebeskyttelsesstoff (for å forebygge eller redusere myokardial dysfunksjon assosiert med behandlingen) eller én eller flere cytokiner til pasienten. I tillegg til ovennevnte terapeutiske regimer kan pasienten underkastes kirurgisk fjerning av kreftceller og/eller strålingsbehandling (f.eks. ekstern stråling eller behandling med et radioaktivt merket stoff, slik som et antistoff), før, samtidig med eller etter antistoffbehandling. Egnede doser for hvilke som helst av ovennevnte samtidig tilførte stoffer er de aktuelt anvendte og kan reduseres på grunn av den kombinerte virkning (synergi) av stoffet og anti-CD79b-antistoffet.

20

Antistoffsammensetningen ifølge oppfinnelsen vil formuleres, doseres og tilføres i samsvar med god medisinsk praksis. Viktige faktorer i denne sammenheng omfatter den særlige forstyrrelsen som blir behandlet, det særlige pattedyret som blir behandlet, den kliniske tilstanden til den enkelte pasient, årsaken til forstyrrelsen, stedet for tilførsel av stoffet, fremgangsmåten for tilførsel, planleggingen av tilførsel og andre faktorer som er kjent for leger. Antistoffet behøver ikke å være, men er eventuelt, formulert med ett eller flere stoffer som for øyeblikket anvendes til å forebygge eller behandle den aktuelle forstyrrelsen. Den virkningsfulle mengden av slike andre stoffer avhenger av mengden av antistoffer ifølge oppfinnelsen til stede i formuleringen, typen av forstyrrelse eller behandling og andre faktorer behandlet ovenfor. Disse anvendes vanligvis i samme doser og med tilførselsruter som anvendt tidligere heri eller ca. fra 1 til 99 % av de hertil anvendte dosene.

35

For forebygging eller behandling av sykdom vil dosen og tilførselsmåten bli valgt av legen ifølge kjente kriterier. Den egnede dosen av antistoff vil avhenge av

- typen av sykdom som skal behandles, som definert ovenfor, sykdommens alvorlighetsgrad og progresjon, enten molekylet tilføres for forebyggende eller terapeutiske formål, tidligere behandling, pasientens kliniske historie og respons på antistoffet og den behandelende legens skjønn. Antistoffet tilføres til pasienten
- 5 passende samtidig eller over en serie behandlinger. Antistoffet tilføres fortrinnsvis ved intravenøs infusjon eller ved subkutane injeksjoner. Avhengig av sykdommens type og alvorlighetsgrad kan ca. 1 µg/kg til ca. 50 mg/kg kroppsvekt (f.eks. ca. 0,1 til 15 mg/kg/dose) antistoff være en innledende kandidatdose for tilførsel til pasienten, enten for eksempel ved én eller flere
- 10 separate tilførsler, eller ved kontinuerlig infusjon. Et doseregime kan omfatte tilførsel av en innledende dose på ca. 4 mg/kg, etterfulgt av en ukentlig vedlikeholdsdose på ca. 2 mg/kg av et anti-CD79b-antistoff. Men andre doseregimer kan være nyttige. Én typisk daglig dose kan være fra ca. 1 µg/kg til 100 mg/kg eller mer, avhengig av faktorene nevnt ovenfor. For gjentatt tilførsel
- 15 over flere dager eller lenger opprettholdes behandlingen, avhengig av tilstanden, til en ønsket suppresjon av sykdomssymptomene forekommer. Progresjonen i denne behandlingen kan enkelt overvåkes ved klassiske fremgangsmåter og assayer og baseres på kriterier som er kjent for legen eller andre fagpersoner.
- 20 Foruten tilførsel av antistoffproteinet til pasienten behandler den foreliggende søknad tilførsel av antistoffet ved genbehandling. Slik tilførsel av nukleinsyre som koder for antistoffet, er omfattet av uttrykket "tilførsel av en terapeutisk virkningsfull mengde av et antistoff". Se for eksempel WO96/07321 publisert 14. mars 1996 om anvendelse av genbehandling for å danne intracellulære
- 25 antistoffer.

- Det finnes to hovedmetoder for å overføre nukleinsyren (eventuelt i en vektor) til pasientens celler, *in vivo* og *ex vivo*. For tilførsel *in vivo* injiseres nukleinsyren direkte i pasienten, vanligvis på det stedet hvor antistoffet kreves. For
- 30 behandling *ex vivo* fjernes pasientens celler, nukleinsyren tilføres til disse isolerte cellene, og de modifiserte cellene tilføres til pasienten enten direkte eller for eksempel innkapslet i porøse membraner som implanteres i pasienten (se for eksempel US-patent nr. 4 892 538 og 5 283 187). Det finnes en rekke teknikker som er tilgjengelige for tilførsel av nukleinsyrer til levedyktige celler. Teknikkene
- 35 varierer avhengig av om nukleinsyren overføres til dyrkede celler *in vitro* eller *in vivo* i den tiltenkte vertens celler. Teknikker som egner seg til overføring av

nukleinsyre til pattedyrceller *in vitro*, omfatter anvendelse av liposomer, elektroporering, mikroinjeksjon, cellefusjon, DEAE-dekstran, kalsiumfosfatutskillingsmetoden osv. En vanlig anvendt vektor for tilførsel *ex vivo* av genet er en retroviral vektor.

5

De aktuelt foretrukne teknikkene for overføring *in vivo* av nukleinsyre omfatter transfeksjon med virale vektorer (slik som adenovirus, herpes simplex I-virus, eller adenoassosiert virus) og lipidbaserte systemer (nyttige lipider for lipidmediert overføring av genet er for eksempel DOTMA, DOPE og DC-Chol). En oversikt over de nåværende kjente genmerkings- og genbehandlingsprotokollene finnes i Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Se også WO 93/25673 og de deri siterte henvisningene.

10

Anti-CD79b-antistoffene ifølge oppfinnelsen kan være i de forskjellige formene omfattet av definisjonen av "antistoff" heri. Antistoffene omfatter således antistoff av full lengde eller intakt antistoff, antistofffragmenter, antistoff med naturlig forekommende sekvens eller aminosyrevarianter, humaniserte eller kimære antistoffer eller fusjonsantistoffer, immunkonjugater og funksjonelle fragmenter derav. I fusjonsantistoffer er en antistoffsekvens fusjonert til en heterolog polypeptidsekvens. Antistoffene kan modifiseres i Fc-regionen for å stille til rådighet ønskede effektorfunksjoner. Som behandlet i mer detalj i avsnittene heri kan det nakne antistoffet bundet på celleoverflaten, med de relevante Fc-regionene, indusere cytotoxiskitet, f.eks. via antistoffavhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC) eller ved rekruttering av komplement i komplementavhengig cytotoxiskitet, eller en annen mekanisme. Hvis det er ønskelig å eliminere eller redusere effektorfunksjon, slik at bivirkninger eller terapeutiske komplikasjoner begrenses, kan eventuelt visse andre Fc-regioner anvendes.

15

20

25

30

I en utførelsesform konkurrerer antistoffet om binding eller binder vesentlig til samme epitop som antistoffene ifølge oppfinnelsen. Antistoffer med de biologiske karakteristikkene av de foreliggende anti-CD79b-antistoffene ifølge oppfinnelsen er også behandlet, spesifikt omfattende tumorutpekelse *in vivo* og eventuell celleproliferasjonsinhibering eller cytotoxiske karakteristikker.

35

Fremgangsmåter for produksjon av ovennevnte antistoffer er beskrevet i detalj heri.

De foreliggende anti-CD79b-antistoffer er nyttige for behandling av CD79b-
5 uttrykkende kreft eller lindring av én eller flere symptomer av kreften hos et pattedyr. Slik kreft omfatter blant annet hematopoietisk kreft eller blodrelatert kreft, slik som lymfom, leukemi, myelom eller lymfoidondartetheter, men også kreft i milten og kreft i lymfeknutene. Mer særlige eksempler på kreft omfatter B-celleassosiert kreft, herunder for eksempel høy-, mellom- og lavgradige
10 lymfomer (omfattende B-cellelymfomer slik som for eksempel slimhinneassosiert lymfoidvev-B-cellelymfom og non-Hodgkins-lymfom, mantelcellelymfom, Burkitts lymfom, småcellet lymfatisk lymfom, marginalsonelymfom, diffust storcellet lymfom, follikulært lymfom og Hodgkins-lymfom og T-cellelymfomer) og leukemier (omfattende sekundærleukemi, kronisk lymfatisk leukemi, slik som B-celleleukemi (CD5+ B-lymfocytter), myeloidleukemi, slik som akutt
15 myeloidleukemi, kronisk myeloidleukemi, lymfoidleukemi, slik som akutt lymfoblastisk leukemi og myelodysplasi) og andre hematologisk og/eller B-celle- eller T-celleassosiert kreft. Kreften omfatter metastatisk kreft av hvilke som helst av foregående. Antistoffet kan binde til minst en del av kreftcellene som
20 uttrykker CD79b-polypeptidet i pattedyret. I en foretrukket utførelsesform er antistoffet virkningsfullt for å destruere eller drepe CD79b-uttrykkende tumorceller eller inhibere veksten av slike tumorceller, *in vitro* eller *in vivo*, ved binding til CD79b-polypeptid på cellen. Et slikt antistoff omfatter et nakent anti-CD79b-antistoff (ikke konjugert til noe stoff). Nakne antistoffer som har
25 cytotoksiske eller cellevekstinhiberende egenskaper, kan videre være utstyrt med et cytotoksisk stoff for å gjøre dem enda mer potente i tumorcelledestruksjon. Cytotoksiske egenskaper kan tildeles til et anti-CD79b-antistoff ved for eksempel konjugering av antistoffet med et cytotoksisk stoff for å danne et immunkonjugat som beskrevet heri. Det cytotoksiske stoffet eller et
30 vekstinhiberende stoff er fortrinnsvis et lite molekyl. Toksiner slik som kalicheamicin eller et maytansinoid og analoger eller derivater derav er foretrukket.

Oppfinnelsen stiller til rådighet en sammensetning omfattende et anti-CD79b-
35 antistoff ifølge oppfinnelsen, og et bærestoff. I sammenheng med behandling av kreft kan sammensetninger tilføres til pasienten med behov for slik behandling,

- hvor sammensetningen kan omfatte én eller flere anti-CD79b-antistoffer til stede som et immunkonjugat eller som det nakne antistoffet. I en ytterligere utførelsesform kan sammensetningene omfatte disse antistoffene i kombinasjon med andre terapeutiske stoffer slik som cytotoksiske eller vekstinhiberende stoffer, herunder kjemoterapeutiske stoffer. Oppfinnelsen stiller også til rådighet 5 formuleringer omfattende et anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen, og et bærestoff. I en utførelsesform er formuleringen en terapeutisk formulering omfattende et farmasøytisk akseptabelt bærestoff.
- 10 Et annet aspekt ifølge oppfinnelsen er isolerte nukleinsyrer som koder for anti-CD79b-antistoffer. Nukleinsyrer som koder både for H- og L-kjedene og spesielt de hypervariable regionsenhetene, kjedene som koder for antistoffet med naturlig forekommende sekvens og varianter, modifikasjoner og humaniserte versjoner av antistoffet, er omfattet.
- 15 Oppfinnelsen stiller også til rådighet fremgangsmåter som er nyttige for behandling av CD79b-polyeptiduttrykkende kreft eller lindring av én eller flere symptomer på kreften i et pattedyr, omfattende tilførsel av en terapeutisk virkningsfull mengde av et anti-CD79b-antistoff til pattedyret. De terapeutiske antistoffsammensetningene kan tilføres kortvarig (akutt) eller kronisk, eller 20 intermitterende som bestemt av legen. Stilt til rådighet er også fremgangsmåter for inhibering av veksten av, og dreping av, en CD79b-polyeptiduttrykkende celle.
- 25 Oppfinnelsen stiller også til rådighet analysesett og anordninger omfattende minst ett anti-CD79b-antistoff. Analysesett inneholdende anti-CD79b-antistoffer finner anvendelse, f.eks. for CD79b-celledrepende assayer, for rensing eller immunutskilling av CD79b-polyeptid fra celler. For isolering og rensing av CD79b kan analysesettet inneholde et anti-CD79b-antistoff koblet til kuler (f.eks. sefarosekuler). Det kan stilles til rådighet analysesett som inneholder 30 antistoffene for påvisning og kvantitering av CD79b *in vitro*, f.eks. i en ELISA eller en Western Blotting. Slikt antistoff som er nyttig for påvisning, kan stilles til rådighet med en markør slik som en fluorescerende markør eller radiomarkør.

I. Behandling med antistofflegemiddelkonjugater

Det er tenkt at antistofflegemiddelkonjugater (ADC) ifølge den foreliggende oppfinnelse kan anvendes til å behandle forskjellige sykdommer eller forstyrrelser, f.eks. karakterisert ved overekspresjon av et tumorantigen. Eksempler på tilstander eller hyperproliferative forstyrrelser omfatter godartede eller ondartede tumorer, leukemi og lymfoidondartetheter. Andre omfatter neuronale, gliale, astrocytale, hypotalamiske, glandulære, makrofagale, epiteliale, stromale, blastocoeliske, inflammatoriske, angiogene og immunologiske, herunder autoimmune, forstyrrelser.

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
- ADC-forbindelsene som er identifisert i dyremodellene og de cellebaserte assayene, kan videre testes hos tumorbærende høyere primater og humane kliniske utprøvinger. Humane kliniske utprøvinger kan være konstruert for å teste virkningen av det monoklonale anti-CD79b-antistoffet eller immunkonjugatet ifølge oppfinnelsen hos pasienter som opplever en B-celleproliferativ forstyrrelse omfattende blant annet lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residiverende indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL), og mantelcellelymfom. Den kliniske utprøvingen kan være konstruert for å evaluere virkningen av et ADC i kombinasjon med kjente terapeutiske regimer, slik som stråling og/eller kjemoterapi omfattende kjente kjemoterapeutiske og/eller cytotoksiske stoffer.

- 25
 - 30
- Sykdommen eller forstyrrelsen som skal behandles, er alminneligvis en hyperproliferativ sykdom slik som en B-celleproliferativ forstyrrelse og/eller B-cellekreft. Eksempler på kreft som skal behandles heri, omfatter blant annet B-celleproliferativ forstyrrelse valgt fra lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

- 35
- Kreften kan omfatte CD79b-uttrykkende celler, slik at ADC-et ifølge den foreliggende oppfinnelse kan binde til kreftcellene. For å bestemme CD79b-ekspresjon i kreften er forskjellige diagnostiske/prognostiske assayer tilgjengelige. I en utførelsesform kan CD79b-overekspresjon analyseres ved IHC.

Parafininnebygde vevssnitt fra en tumorbiopsi kan underkastes IHC-assayet og tildeles et CD79b-proteinfargeintensitetskriterium med hensyn til graden av farging og i hvilken proporsjon av undersøkte tumorceller.

- 5 For forebygging eller behandling av sykdom vil den egnede dosen av et ADC avhenge av typen av sykdom som skal behandles, som definert ovenfor, sykdommens alvorlighetsgrad og progresjon, enten molekylet tilføres for forebyggende eller terapeutiske formål, tidligere behandling, pasientens kliniske historie og respons på antistoffet og den behandlende legens skjønn. Molekylet
- 10 tilføres til pasienten passende samtidig eller over en serie behandlinger. Avhengig av sykdommens type og alvorlighetsgrad er ca. 0,1 µg/kg til 15 mg/kg (f.eks. 0,1 mg/kg-20 mg/kg) av molekyl en innledende kandidatdose for tilførsel til pasienten, enten for eksempel ved én eller flere separate tilførsler, eller ved kontinuerlig infusjon. Én typisk daglig dose kan være fra ca. 1 µg/kg til
- 15 100 mg/kg eller mer, avhengig av faktorene nevnt ovenfor. Et eksempel på en dose av ADC som skal tilføres til en pasient, er i området fra ca. 0,1 til ca. 10 mg/kg pasientvekt.

- For gjentatt tilførsel over flere dager eller lenger opprettholdes behandlingen,
- 20 avhengig av tilstanden, til en ønsket suppresjon av sykdomssymptomene forekommer. Et eksempel på et doseregime omfatter tilførsel av en innledende dose på ca. 4 mg/kg, etterfulgt av en ukentlig vedlikeholdsdose på ca. 2 mg/kg av et anti-ErbB2-antistoff. Andre doseregimer kan være nyttige. Progresjonen i denne behandlingen kan enkelt overvåkes ved klassiske teknikker og assayer.

25 **J. Kombinasjonsbehandling**

- Et antistofflegemiddelkonjugat (ADC) ifølge oppfinnelsen kan kombineres i en farmasøytisk kombinasjonsformulering, eller et doseregime som kombinasjonsbehandling, med en andre forbindelse med antikreftegenskaper.
- 30 Den andre forbindelsen med den farmasøytiske kombinasjonsformuleringen eller doseregimet har fortrinnsvis komplementære aktiviteter til kombinasjonens ADC, slik at de ikke virker negativt på hverandre.

- Den andre forbindelsen kan være et kjemoterapeutisk stoff, et cytotoksisk stoff,
- 35 et cytokin, et vekstinhiberende stoff, et antihormonstoff og/eller et

hjerterbeskyttelsesstoff. Slike molekyler er passende til stede i kombinasjon i mengder som er virkningsfulle for det tiltenkte formålet. En farmasøytisk sammensetning inneholdende et ADC ifølge oppfinnelsen kan også ha en terapeutisk virkningsfull mengde av et kjemoterapeutisk stoff slik som en
5 tubulindannende inhiberer, en topoisomeraseinhiberer eller en DNA-binder.

I et aspekt er den første forbindelsen et anti-CD79b-ADC ifølge oppfinnelsen, og den andre forbindelsen er et anti-CD20 antistoff (enten et nakent antistoff eller et ADC). I en utførelsesform er den andre forbindelsen et anti-CD20-antistoff
10 rituksimab (Rituxan®) eller 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Et annet antistoff som er nyttig for kombinert immunterapi med anti-CD79b-ADC-er ifølge oppfinnelsen, omfatter blant annet anti-VEGF (f.eks. Avastin®).

Andre terapeutiske regimer kan kombineres med tilførsel av et antikreftstoff
15 identifisert i samsvar med denne oppfinnelse, herunder blant annet strålingsterapi og/eller transplantasjon fra benmarg og perifert blod, og/eller et cytotoxisk stoff, et kjemoterapeutisk stoff eller et vekstinhiberende stoff. I én av slike utførelsesformer er et kjemoterapeutisk stoff et stoff eller en kombinasjon av stoffer slik som for eksempel syklofosamid,
20 hydroksydaunorubicin, adriamycin, doksorubincin, vinkristin (Oncovin™), prednisolon, CHOP, CVP eller COP, eller immunterapeutikk slik som anti-CD20 (f.eks. Rituxan®) eller anti-VEGF (f.eks. Avastin®).

Kombinasjonsbehandlingen kan tilføres som et samtidig eller sekvensielt regime.
25 Når kombinasjonen tilføres sekvensielt, kan den tilføres i to eller flere tilførsler. Den kombinerte tilførselen omfatter samtidig tilførsel ved hjelp av separate formuleringer eller en enkelt farmasøytisk formulering, og sammenhengende tilførsel i vilkårlig rekkefølge, hvor det fortrinnsvis er et tidsrom hvor begge (eller alle) virkestoffene viser sin biologiske aktivitet samtidig.

30

I en utførelsesform omfatter behandling med et ADC den kombinerte tilførsel av et antikreftstoff identifisert heri, og ett eller flere kjemoterapeutiske stoffer eller vekstinhiberende stoffer, herunder samtidig tilførsel av cocktailer av forskjellige kjemoterapeutiske stoffer. Kjemoterapeutiske stoffer omfatter taksaner (slik som
35 paklitaxel og docetaxel) og/eller antrasyklinantibiotika. Fremstilling og doseplaner for slike kjemoterapeutiske stoffer kan anvendes ifølge produsentens

anvisninger eller som bestemt empirisk av fagpersonen. Fremstilling og doseplaner for slik kjemoterapi er også beskrevet i "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

- 5 Egnede doser for et hvilket som helst av de ovenfor samtidig tilførte stoffene er dem som anvendes for øyeblikket, og kan senkes på grunn av den kombinerte virkning (synergi) av det nylig identifiserte stoffet og andre kjemoterapeutiske stoffer eller behandlinger.
- 10 Kombinasjonsbehandlingen kan stille til rådighet "synergi" og være "synergistisk", dvs. den virkning som oppnås når virkestoffene som anvendes sammen, er større enn virkningen av å anvende forbindelsene separat. En synergistisk virkning kan oppnås når virkestoffene: 1) ko-formuleres og tilføres samtidig i en kombinert enhetsdoseformulering, 2) tilføres vekselvis eller
15 parallelt som separate formuleringer, eller 3) er ved et annet regime. Ved tilførsel under vekselbehandling kan en synergistisk virkning oppnås når forbindelsene tilføres sekvensielt, f.eks. ved forskjellige injeksjoner i separate sprøyter. Under vekselbehandling tilføres en virkningsfull dose av hvert virkestoff alminneligvis sekvensielt, dvs. serielt, mens under kombinasjonsbehandling
20 tilføres virkningsfulle doser av to eller flere virkestoffer sammen.

K. Anordninger og analysesett

- En annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en anordning inneholdende materialer som er nyttige for behandling, forebygging og/eller diagnostisering av
- 25 CD79b-uttrykkende kreft. Anordningen omfatter en beholder og en etikett eller et pakningsvedlegg på eller assosiert med beholderen. Egnede beholdere omfatter for eksempel flasker, glass, sprøyter osv. Beholderne kan være dannet fra en rekke materialer slik som glass eller plast. Beholderen inneholder en sammensetning som er virkningsfull for behandling, forebygging og/eller
30 diagnostisering av krefttilstanden og kan ha en steril tilgangsport (f.eks. beholderen kan være en intravenøs løsningspose eller et glass med en kork som kan perforeres med en hypodermisk injeksjonsnål). Minst ett virkestoff i sammensetningen er et anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen. Etiketten eller pakningsvedlegget angir at sammensetningen anvendes til behandling av kreft.
35 Etiketten eller pakningsvedlegget vil videre omfatte anvisninger for tilførsel av

antistoffsammensetningen til kreftpasienten. Anordningen kan videre i tillegg omfatte en andre beholder omfattende en farmasøytisk akseptabel buffer, slik som bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI), fosfatbufret saltløsning, Ringers løsning og dekstroseløsning. Den kan videre omfatte andre materialer som er

5 ønskelige fra et handels- eller brukerperspektiv, herunder andre buffere, fortynningsmidler, filtre, nåler og sprøyter.

Det er også stilt til rådighet analysesett som er nyttige for forskjellige formål, f.eks. for assayer av CD79b-uttrykkende celledreping, for rensing eller

10 immunutfelling av CD79b-polypeptid fra celler. For isolering og rensing av CD79b-polypeptid kan analysesettet inneholde et anti-CD79b-antistoff koblet til kuler (f.eks. sefarosekuler). Det kan være stilt til rådighet analysesett som inneholder antistoffene for påvisning og kvantitering av CD79b-polypeptid *in vitro*, f.eks. i en ELISA eller en Western Blotting. Som med anordningen omfatter

15 analysesettet en beholder og en etikett eller et pakningsvedlegg på eller assosiert med beholderen. Beholderen inneholder en sammensetning omfattende minst ett anti-CD79b-antistoff ifølge oppfinnelsen. Ytterligere beholdere kan være omfattet, hvilke inneholder for eksempel fortynningsmidler og buffere, kontrollantistoffer. Etiketten eller pakningsvedlegget kan stille til rådighet en

20 beskrivelse av sammensetningen og anvisninger for den tiltenkte anvendelse *in vitro* eller til påvisning.

L. Anvendelser for CD79b-polypeptider

Beskrevet heri er fremgangsmåter for screening av forbindelser for å identifisere

25 dem som kopierer CD79b-polypeptidet (agonister) eller forhindrer virkningen av CD79b-polypeptidet (antagonister). Screeningassayer for antagonistlegemiddelkandidater er beregnet på å identifisere forbindelser som binder eller kompleksere med CD79b-polypeptidene kodet av genene identifisert heri, eller på annen måte forstyrrer vekselvirkningen mellom de kodede

30 polypeptidene og andre cellulære proteiner, herunder for eksempel inhibering av ekspresjonen av CD79b-polypeptid fra celler. Slike screeningassayer vil omfatte assayer som er mottagelige for screening med høy gjennomstrømningshastighet av kjemiske biblioteker, hvilket gjør dem særlig egnet til identifikasjon av små molekyllgemiddelkandidater.

Assayene kan utføres i en rekke formater, herunder protein-protein-bindingsassayer, biokjemiske screeningsassayer, immunassayer og cellebaserte assayer, som er vel karakterisert i teknikken.

- 5 Alle assayer for antagonist har det til felles at de krever opprettelse av kontakt mellom legemiddelkandidaten og et CD79b-polypeptid kodet av en nukleinsyre identifisert heri under betingelser og i et tilstrekkelig tidsrom til å gi disse to komponentene mulighet til å vekselvirke.
- 10 I bindingsassayer er vekselvirkningen binding, og det dannede komplekset kan isoleres eller påvises i reaksjonsblandingen. I en særlig utførelsesform immobiliseres CD79b-polypeptidet kodet av genet identifisert heri eller legemiddelkandidaten på en fast fase, f.eks. på en mikrotiterplate, ved kovalente eller ikke-kovalente bindinger. Ikke-kovalent binding oppnås vanligvis ved
15 belegging av den faste overflaten med en løsning av CD79b-polypeptidet og tørking. Et immobilisert antistoff, f.eks. et monoklonalt antistoff, spesifikt for CD79b-polypeptidet som skal immobiliseres, kan eventuelt anvendes for å forankre det på en fast overflate. Assayet utføres ved tilsetning av den ikke-immobiliserte komponenten, som kan være merket med en påvisbar markør, til
20 den immobiliserte komponenten, f.eks. den belagte overflaten inneholdende den forankrede komponenten. Når reaksjonen er fullført, fjernes de ikke-omsatte komponentene, f.eks. ved skylling, og komplekser forankret på den faste overflaten påvises. Når den opprinnelige ikke-immobiliserte komponenten bærer en påvisbar markør, angir påvisningen av markøren immobilisert på overflaten at
25 det har skjedd kompleksering. Når den opprinnelig ikke-immobiliserte komponenten ikke bærer en markør, kan kompleksering påvises for eksempel ved hjelp av et merket antistoff som binder det immobiliserte komplekset spesifikt.
- 30 Hvis kandidatforbindelsen vekselvirker med, men ikke binder til et særlig CD79b-polypeptid kodet av et gen identifisert heri, kan dens vekselvirkning med dette polypeptidet analyseres ved fremgangsmåter som er velkjent for påvisning av protein-protein-vekselvirkninger. Slike assayer omfatter tradisjonelle metoder, slik som for eksempel kryssbinding, ko-immunutfelling og ko-rensing gjennom
35 gradienter eller kromatografiske kolonner. Protein-protein-vekselvirkninger kan i tillegg overvåkes ved hjelp av et gjærbasert genetisk system beskrevet av Fields

og medarbeidere (Fields and Song, Nature (London), 340:245–246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578–9582 (1991)) som beskrevet av Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789–5793 (1991). Mange transkripsjonelle aktivatorer, slik som gjær GAL4, består av to fysisk diskrete moduldomerer, idet det ene fungerer som DNA-bindingsdomene og det andre fungerer som transkripsjonsaktiveringsdomene. Gjærekspresjonssystemet beskrevet i de foregående publikasjonene (vanligvis betegnet "tohybridsystem") drar fordel av denne egenskapen og benytter tohybridproteiner, et hvor målproteinet er fusjonert til DNA-bindingsdomenet av GAL4, og et annet hvor kandidataktiverende proteiner er fusjonert til aktiveringsdomenet. Ekspresjonen av et GAL1-*lacZ*-reportergen under kontroll av en GAL4-aktivert promotor avhenger av rekonstitusjon av GAL4-aktivitet via protein-protein-vekselvirkning. Kolonier inneholdende vekselvirkende polypeptider er påvist med et kromogent substrat for β -galaktosidase. Et komplett analysesett (MATCHMAKER™) for identifikasjon av protein-protein-vekselvirkninger mellom to spesifikke proteiner ved hjelp av tohybridteknikken er kommersielt tilgjengelig fra Clontech. Dette systemet kan også utvides til å kartlegge proteindomerer involvert i spesifikke proteinvekselvirkninger og for å påvise aminosyreenheter som er viktige for disse vekselvirkningene.

Forbindelser som forstyrrer vekselvirkningen av et gen som koder for et CD79b-polypeptid identifisert heri og andre intra- eller ekstracellulære komponenter, kan testes på følgende måte: Det fremstilles vanligvis en reaksjonsblanding inneholdende produktet av genet og den intra- eller ekstracellulære komponenten under betingelser og i et tidsrom som gir mulighet for vekselvirkningen og bindingen av de to produktene. For å teste en kandidatforbindelses evne til å inhibere binding analyseres reaksjonen under fravær og nærvær av testforbindelsen. Et placebo kan i tillegg tilsettes til en tredje reaksjonsblanding som positiv kontroll. Bindingen (kompleksdannelse) mellom testforbindelsen og den intra- eller ekstracellulære komponenten i blandingen overvåkes som beskrevet ovenfor. Dannelsen av et kompleks i kontrollreaksjonene, men ikke i reaksjonsblandingen inneholdende testforbindelsen, angir at testforbindelsen forstyrrer vekselvirkningen mellom testforbindelsen og dens reaksjonspartner.

For å teste for antagonister kan CD79b-polypeptidet tilsettes til en celle sammen med forbindelsen som skal screenes for en bestemt aktivitet, og forbindelsens evne til å inhibere aktiviteten av interesse under nærvær av CD79b-polypeptidet angir at forbindelsen er en antagonist for CD79b-polypeptid. Antagonister kan eventuelt påvises ved å kombinere CD79b-polypeptidet og en potensiell antagonist med membranbundne CD79b-polypeptidreseptorer eller rekombinante reseptorer under egnede betingelser for et kompetitivt inhiberingsassay. CD79b-polypeptidet kan merkes, slik som ved radioaktivitet, slik at antallet CD79b-polypeptidmolekyler bundet til reseptoren kan anvendes til å fastslå den potensielle antagonistens effektivitet. Genet som koder for reseptoren, kan identifiseres ved en rekke fremgangsmåter som er kjent for fagpersoner, f.eks. ligandpanorering og FACS-sortering. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991). Ekspresjonskloning benyttes fortrinnsvis hvor polyadenylert RNA fremstilles fra en celle som er responsiv overfor CD79b-polypeptidet, og et cDNA-bibliotek dannet fra dette RNA-et deles i pooler og anvendes til å transfekte COS-celler eller andre celler som ikke er responsive overfor CD79b-polypeptidet. Transfekteerte celler som er dyrket på glassdiapositiver, eksponeres for merket CD79b-polypeptid. CD79b-polypeptidet kan merkes på en rekke måter, herunder jodering eller inkludering av et gjenkjenningssted for en stedsspesifikk proteinkinase. Etter fiksering og inkubering underkastes diapositivene autoradiografisk analyse. Positive pooler identifiseres, og subpooler fremstilles og retransfekteres ved hjelp av en interaktiv subpoolings- og rescreeningsmetode, hvilket til slutt gir en enkelt klon som koder for den putative reseptoren.

Som en alternativ metode for reseptoridentifikasjon kan merket CD79b-polypeptid fotoaffinitetsbindes med cellemembran- eller ekstraktfremstillinger som uttrykker reseptormolekylet. Kryssbundet materiale løses opp ved PAGE og eksponeres for røntgenfilm. Det merkede komplekset inneholdende reseptoren kan skjæres ut, løses opp i peptidfragmenter og underkastes proteinmikrosekvensering. Aminosyresekvensen oppnådd fra mikrosekvensering ville bli anvendt til å konstruere et sett av nedbrutte oligonukleotidsonder for å screene et cDNA-bibliotek og identifisere genet som koder for den putative reseptor.

I et annet assay for antagonister ville pattedyrceller eller en membranfremstilling som uttrykker reseptoren, bli inkubert med merket CD79b-polypeptid under nærvær av kandidatforbindelsen. Forbindelsens evne til å forsterke eller blokkere denne vekselvirkningen kan da måles.

5

Mer spesifikke eksempler på potensielle antagonister omfatter et oligonukleotid som binder til fusjonene av immunglobulin med CD79b-polypeptid, og særlig antistoffer omfattende blant annet poly- og monoklonale antistoffer og antistofffragmenter, enkjedede antistoffer, antiidiotypiske antistoffer og kimære

10 eller humaniserte versjoner av slike antistoffer eller fragmenter samt humane antistoffer og antistofffragmenter. En potensiell antagonist kan eventuelt være et nært relatert protein, f.eks. en mutert form av CD79b-polypeptid som gjenkjenner reseptoren, men ikke tildeler noen virkning, hvilket kompetitivt inhiberer CD79b-polypeptidets virkning.

15

Antistoffer som spesifikt binder et CD79b-polypeptid identifisert heri, og andre molekyler identifisert ved screeningsassayer beskrevet tidligere heri, kan tilføres for behandling av forskjellige forstyrrelser, herunder kreft, i form av farmasøytiske sammensetninger.

20

Hvis CD79b-polypeptidet er intracellulært og hele antistoffer anvendes som inhibererere, foretrekkes internalisering av antistoffer. Men lipofeksjoner eller liposomer kan også anvendes til å tilføre antistoffet, eller et antistofffragment, til celler. Når antistofffragmenter anvendes, foretrekkes det minste inhiberende

25 fragmentet som spesifikt binder til målproteinets bindingsdomene. Basert på sekvensene i et antistoffs variable region kan det for eksempel være konstruert peptidmolekyler som bevarer evnen til å binde målproteinsekvensen. Slike peptider kan syntetiseres kjemisk og/eller fremstilles ved rekombinant DNA teknologi. Se for eksempel Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889–

30 7893 (1993).

Formuleringen heri kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse som nødvendig for den bestemte indikasjon som blir behandlet, fortrinnsvis dem med komplementære aktiviteter som ikke virker negativt på hverandre.

35 Sammensetningen kan eventuelt eller i tillegg omfatte et stoff som forbedrer dets funksjon, slik som for eksempel et cytotoxisk stoff, et cytokin, et

kjemoterapeutisk stoff eller et vekstinhiberende stoff. Slike molekyler er passende til stede i kombinasjon i mengder som er virkningsfulle for det tiltenkte formålet.

M. Antistoffderivater

5

Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan modifiseres ytterligere til å inneholde ytterligere ikke-proteinholdige enheter som er kjent i teknikken og lett tilgjengelige. Enhetene som er egnet til avledning av antistoffet, er fortrinnsvis vannløselige polymerer. Ikke-begrensede eksempler på vannløselige polymerer

10 omfatter blant annet polyetylglykol (PEG), kopolymerer av etylenglykol/propylenglykol, karboksymetylcellulose, dekstran, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, poly-1, 3-dioksolan, poly-1,3,6-trioksan, etylen/maleinanhydridkopolymer, polyaminosyrer (enten homopolymerer eller tilfeldige kopolymerer) og dekstran eller poly(n-vinylpyrrolidon)polyetylglykol,

15 propropylenglykolhomopolymerer, polypropylenoksid/etylenoksidkopolymerer, polyoksyetylerter polyoler (f.eks. glycerol), polyvinylalkohol og blandinger derav. Polyetylglykolpropionaldehyd kan ha produksjonsfordeler på grunn av sin stabilitet i vann. Polymeren kan ha enhver molekylvekt og kan være forgrenet eller uforgrenet. Antallet av polymerer bundet til antistoffet kan variere, og hvis

20 mer enn én polymer er bundet, kan de ha samme eller forskjellige molekyler. Antallet og/eller typen av polymerer anvendt til avledning kan bestemmes basert på vurderinger omfattende blant annet de særlige egenskapene eller funksjonene til antistoffet som skal forbedres, hvorvidt antistoffderivatet skal anvendes til behandling under definerte betingelser osv.

25 **N. Fremgangsmåte for screening**

Enda en annen utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for bestemmelse av forekomst av et CD79b-polypeptid i en prøve som antas å inneholde CD79b-polypeptidet, hvor fremgangsmåten

30 omfatter eksponering av prøven for et antistofflegemiddelkonjugat derav som binder til CD79b-polypeptidet, og bestemmelse av binding av antistofflegemiddelkonjugatet derav, mot CD79b-polypeptidet i prøven, hvor forekomst av slik binding er indikativt for forekomst av CD79b-polypeptid i

prøven. Prøven kan eventuelt inneholde celler (som kan være kreftceller) som antas å uttrykke CD79b-polypeptidet. Antistofflegemiddelkonjugatet derav, benyttet i fremgangsmåten, kan eventuelt være påvisbart merket, bundet til en fast fase, eller lignende.

5

En annen utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for diagnostisering av forekomst av en tumor hos et pattedyr, hvor fremgangsmåten omfatter a) opprettelse av kontakt mellom en testprøve omfattende vevsceller oppnådd fra pattedyret og et antistofflegemiddelkonjugat derav som binder til et CD79b-polypeptid og b) påvisning av dannelsen av et kompleks mellom antistofflegemiddelkonjugatet derav og CD79b-polypeptidet i testprøven, hvor dannelsen av et kompleks er indikativt for forekomst av en tumor hos pattedyret. Antistofflegemiddelkonjugatet derav er eventuelt påvisbart merket, bundet til en fast fase, eller lignende, og/eller testprøven for vevsceller oppnås fra en person som antas å ha en krefttumor.

10

15

IV. Ytterligere fremgangsmåter for anvendelse av anti-CD79b-antistoffer og immunkonjugater

A. Diagnostiske fremgangsmåter og fremgangsmåter for påvisning

20

I et aspekt er anti-CD79b-antistoffer og immunkonjugater ifølge oppfinnelsen nyttige for påvisning av forekomst av CD79b i en biologisk prøve. Med "påvisning" menes som anvendt heri kvantitativ eller kvalitativ påvisning. I visse utførelsesformer omfatter en biologisk prøve en celle eller et vev. I visse utførelsesformer omfatter slikt vev normalt og/eller kreftfremkallende vev som uttrykker CD79b ved høyere nivåer i forhold til annet vev, f.eks. B-celler og/eller B-celleassosiert vev.

25

30

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en fremgangsmåte for påvisning av forekomst av CD79b i en biologisk prøve. I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten opprettelse av kontakt mellom den biologiske prøven og et anti-CD79b-antistoff under betingelser som gir mulighet for binding av anti-

CD79b-antistoffet til CD79b, og påvisning av hvorvidt et kompleks dannes mellom anti-CD79b-antistoffet og CD79b.

- I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet en fremgangsmåte for diagnostisering
- 5 av en forstyrrelse assosiert med økt ekspresjon av CD79b. I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten opprettelse av kontakt mellom en testcelle og et anti-CD79b-antistoff, bestemmelse av nivået av ekspresjon (enten kvantitativt eller kvalitativt) av CD79b ved testcellen ved påvisning av binding av anti-CD79b-antistoffet til CD79b og sammenligning av nivået av
- 10 ekspresjon av CD79b ved testcellen med nivået av ekspresjon av CD79b ved en kontrollcelle (f.eks. en normal celle av samme vevsopprinnelse som testcellen eller en celle som uttrykker CD79b ved nivåer som kan sammenlignes med en slik normal celle), hvor et høyere nivå av ekspresjon av CD79b ved testcellen ved sammenligning med kontrollcellen angir forekomst av en forstyrrelse
- 15 assosiert med økt ekspresjon av CD79b. I visse utførelsesformer oppnås testcellen fra en person som antas å ha en forstyrrelse assosiert med økt ekspresjon av CD79b. I visse utførelsesformer er forstyrrelsen en celleproliferativ forstyrrelse, slik som kreft eller en tumor.
- 20 Eksempler på celleproliferative forstyrrelser som kan diagnostiseres ved hjelp av et antistoff ifølge oppfinnelsen, omfatter en B-celleforstyrrelse og/eller a B-celleproliferativ forstyrrelse omfattende blant annet lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL),
- 25 småcellet lymfocytisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

- I visse utførelsesformer omfatter en fremgangsmåte for diagnostisering eller påvisning, slik som dem beskrevet ovenfor, påvisning av binding av et anti-
- 30 CD79b-antistoff til CD79b uttrykt på overflaten av en celle eller i en membranfremstilling oppnådd fra en celle som uttrykker CD79b på sin overflate. I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten opprettelse av kontakt mellom en celle og et anti-CD79b-antistoff under betingelser som gir mulighet for binding av anti-CD79b-antistoffet til CD79b, og påvisning av hvorvidt et
- 35 kompleks dannes mellom anti-CD79b-antistoffet og CD79b på celleoverflaten. Et

eksempel på assay for påvisning av binding av et anti-CD79b-antistoff til CD79b uttrykt på overflaten av en celle er en "FACS"-assay.

5 Visse andre fremgangsmåter kan anvendes til å påvise binding av anti-CD79b-antistoffer til CD79b. Slike fremgangsmåter omfatter blant annet antigenbindingsassayer som er velkjent i teknikken, slik som Western Blotting, radioimmunassayer. ELISA (enzymbundet antistoffassay), "sandwich"-immunassayer, immunutfellingsassayer, fluorescerende immunassayer, protein A-immunassayer og immunhistokjemi (IHC).

10

I visse utførelsesformer er anti-CD79b-antistoffer merket. Markørene omfatter blant annet markører eller enheter som påvises direkte (slik som fluorescerende, kromofore, elektrontyke, kjemiluminescerende og radioaktive markører) og enheter, slik som enzymer eller ligander, som påvises indirekte, f.eks. gjennom en enzymatisk reaksjon eller molekylær vekselvirkning. Eksempler på markører 15 omfatter blant annet radioisotopene ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H og ^{131}I , fluorforer slik som chelater av sjeldne jordarter eller fluorescein og dets derivativer, rhodamin og dets derivativer, dansyl, umbelliferon, luciferaser, f.eks. ildflueluciferase og bakteriell luciferase (US-patent nr. 4 737 456), luciferin, 2,3-dihydroftalazinedioner, pepperrotperoksidase (HRP), alkalisk fosfatase, β -galaktosidase, glukoamylase, lysozyme, sakkaridoksidaser, f.eks. glukoseoksidase, galaktoseoksidase og glukose-6-fosfat, dehydrogenase, heterosykliske oksidaser slik som urikase og xantinoksidase, koblet med et enzym som benytter hydrogenperoksid for å oksidere en fargestoff-forløper slik 20 som HRP, laktoperoksidase eller mikroperoksidase, biotin/avidin, spinnmarkører, bakteriofage markører, stabile frie radikaler og lignende.

25

I visse utførelsesformer er anti-CD79b-antistoffer immobilisert på en uløselig matrise. Immobilisering omfatter separasjon av anti-CD79b-antistoffet fra 30 ethvert CD79b som forblir fritt i løsning. Dette oppnås klassisk ved enten uoppløseliggjørelse av anti-CD79b-antistoffet før assayprosedyren, som ved adsorpsjon til en vannuløselig matrise eller overflate (Bennich et al., US 3 720 760), eller ved kovalent binding (f.eks. ved hjelp av glutaraldehydkryssbinding), eller ved uoppløseliggjørelse av anti-CD79b-antistoffet etter dannelse av et kompleks mellom anti-CD79b-antistoffet og 35 CD79b, f.eks. ved immunutfelling.

En hvilken som helst av ovennevnte utførelsesformer for diagnostisering eller påvisning kan utføres ved hjelp av et immunkonjugat ifølge oppfinnelsen i stedet for eller i tillegg til et anti-CD79b-antistoff.

5 **B. Terapeutiske fremgangsmåter**

Et antistoff eller immunkonjugat ifølge oppfinnelsen kan anvendes til for eksempel terapeutiske fremgangsmåter in vitro, ex vivo og in vivo. I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet fremgangsmåter for inhibering av cellevekst eller

10 -proliferasjon, enten in vivo eller in vitro, idet fremgangsmåten omfatter eksponering av en celle for et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat derav under betingelser som gir mulighet for binding av immunkonjugatet til CD79b. Med "inhibering av cellevekst eller -proliferasjon" menes reduksjon av cellens vekst eller proliferasjon med minst 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 15 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 100 %, og omfatter induksjon av celledød. I visse utførelsesformer er cellen en tumorcelle. I visse utførelsesformer er cellen en B-celle. I visse utførelsesformer er cellen et xenograft, f.eks. som eksemplifisert heri.

20 I et aspekt anvendes et antistoff eller immunkonjugat ifølge oppfinnelsen til behandling eller forebygging av en B-celleproliferativ forstyrrelse. I visse utførelsesformer er celleproliferativ forstyrrelse assosiert med økt ekspresjon og/eller aktivitet av CD79b. I visse utførelsesformer er den B-celleproliferative forstyrrelsen for eksempel assosiert med økt ekspresjon av CD79b på overflaten

25 av en B-celle. I visse utførelsesformer er den B-celleproliferative forstyrrelsen en tumor eller kreft. Eksempler på B-celleproliferative forstyrrelser som skal behandles med antistoffene eller immunkonjugatene ifølge oppfinnelsen, omfatter blant annet lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært

30 indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

I et aspekt stiller oppfinnelsen til rådighet fremgangsmåter for behandling av en

35 B-celleproliferativ forstyrrelse omfattende tilførsel til en person av en

virkningsfull mengde av et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat derav. I visse utførelsesformer omfatter en fremgangsmåte for behandling av en B-celleproliferativ forstyrrelse tilførsel til en person av en virkningsfull mengde av en farmasøytisk formulering omfattende et anti-CD79b-antistoff eller anti-
5 CD79b-immunkonjugat og eventuelt minst ett ytterligere terapeutisk stoff, slik som dem stilt til rådighet nedenfor. I visse utførelsesformer omfatter en fremgangsmåte for behandling av en celleproliferativ forstyrrelse tilførsel til en person av en virkningsfull mengde av en farmasøytisk formulering omfattende 1) et immunkonjugat omfattende et anti-CD79b-antistoff og et cytotoxisk stoff, og
10 eventuelt 2) minst ett ytterligere terapeutisk stoff, slik som dem stilt til rådighet nedenfor.

I et aspekt kan minst noen av antistoffene eller immunkonjugatene ifølge oppfinnelsen binde CD79b fra andre arter enn menneske. Antistoffer eller
15 immunkonjugater ifølge oppfinnelsen kan følgelig anvendes til å binde CD79b, f.eks. i en cellekultur inneholdende CD79b, hos mennesker, eller hos andre pattedyr med et CD79b hvormed et antistoff eller immunkonjugat ifølge oppfinnelsen kryssreagerer (f.eks. sjimpanse, bavian, silkeape, cynomolgus- og rhesus-aper, svin eller mus). I en utførelsesform kan et anti-CD79b-antistoff
20 eller immunkonjugat anvendes til utpekelse av CD79b på B-celler ved opprettelse av kontakt mellom antistoffet eller immunkonjugatet og CD79b for å danne et antistoff- eller immunkonjugatantigenkompleks slik at et konjugert cytotoxin av immunkonjugatet får tilgang til innsiden av cellen. I en utførelsesform er CD79b humant CD79b.

25

I en utførelsesform kan et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat anvendes i en fremgangsmåte for binding av CD79b hos en person med en forstyrrelse assosiert med økt CD79b-ekspresjon og/eller -aktivitet, idet fremgangsmåten omfatter tilførsel til personen av antistoffet eller immunkonjugatet, slik at CD79b
30 hos personen bindes. I en utførelsesform internaliseres det bundne antistoffet eller immunkonjugatet i B-cellen som uttrykker CD79b. I en utførelsesform er CD79b humant CD79b, og personen er et menneske. Personen kan eventuelt være et pattedyr som uttrykker CD79b hvortil et anti-CD79b-antistoff binder. Enda videre kan personen være et pattedyr hvortil CD79b tilføres (f.eks. ved
35 tilførsel av CD79b eller ved ekspresjon av et transgen som koder for CD79b).

- Et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat kan tilføres til et menneske i sammenheng med diagnostisering. Et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat kan videre tilføres til et ikke-humant pattedyr som uttrykker CD79b hvormed antistoffet kryssreagerer (f.eks. et primat, et svin, en rotte eller en mus) for veterinære formål eller som en dyremodell av human sykdom. Med hensyn til sistnevnte kan slike dyremodeller være nyttige for evaluering av den terapeutiske virkningen av antistoffer eller immunkonjugater ifølge oppfinnelsen (f.eks. testing av doser og tidsrom for tilførsel).
- 5
- 10 Antistoffer eller immunkonjugater ifølge oppfinnelsen kan anvendes enten alene eller i kombinasjon med andre sammensetninger i en behandling. Et antistoff eller immunkonjugat ifølge oppfinnelsen kan for eksempel tilføres samtidig med minst ett ytterligere terapeutisk stoff og/eller hjelpestoff. I visse utførelsesformer er et ytterligere terapeutisk stoff et cytotoksisk stoff, et
- 15 kjemoterapeutisk stoff eller et vekstinhiberende stoff. I én av slike utførelsesformer er et kjemoterapeutisk stoff et stoff eller en kombinasjon av stoffer slik som for eksempel syklofosamid, hydroksydaunorubicin, adriamycin, doksorubicin, vinkristin (Oncovin™), prednisolon, CHOP, CVP eller COP, eller immunterapeutikk slik som anti-CD20 (f.eks. Rituxan®) eller anti-VEGF (f.eks.
- 20 Avastin®), hvor kombinasjonbehandlingen er nyttig for behandling av kreft og/eller B-celleforstyrrelser slik som B-celleproliferative forstyrrelser omfattende lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi
- 25 (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og mantelcellelymfom.

Slike kombinasjonsbehandlinger som nevnt ovenfor omfatter kombinert tilførsel (hvor to eller flere terapeutiske stoffer er omfattet i samme eller separate formuleringer), og separat tilførsel, hvor tilførsel av antistoffet eller

30 immunkonjugatet ifølge oppfinnelsen kan skje før, samtidig med og/eller etter tilførsel av det ytterligere terapeutiske stoffet og/eller hjelpestoffet. Antistoffer eller immunkonjugater ifølge oppfinnelsen kan også anvendes i kombinasjon med strålingsbehandling.

- 35 Et antistoff eller immunkonjugat ifølge oppfinnelsen (og ethvert ytterligere terapeutisk stoff eller hjelpestoff) kan tilføres ved ethvert egnet middel,

- herunder parenteral, subkutan, intraperitoneal, intrapulmonal og intranasal, og eventuelt for lokal behandling, intralesjonal tilførsel. Parenterale infusjoner omfatter intramuskulær, intravenøs, intraarterial, intraperitoneal eller subkutan tilførsel. Antistoffet eller immunkonjugatet tilføres i tillegg passende ved
- 5 pulsinfusjon, særlig med avtagende doser av antistoffet eller immunkonjugatet. Dosering kan skje ved enhver egnet rute, f.eks. ved injeksjoner, slik som intravenøse eller subkutane injeksjoner, avhengig til dels av hvorvidt tilførselen er kortvarig eller kronisk.
- 10 Antistoffer eller immunkonjugater ifølge oppfinnelsen ville være formulert, dosert og tilført på en måte som samsvarer med god medisinsk praksis. Viktige faktorer i denne sammenhengen omfatter den særlige forstyrrelsen som blir behandlet, det særlige pattedyret som blir behandlet, den kliniske tilstanden til den enkelte pasient, årsaken til forstyrrelsen, stedet for tilførsel av stoffet, fremgangsmåten
- 15 for tilførsel, planleggingen av tilførsel og andre faktorer som er kjent for leger. Antistoffet eller immunkonjugatet behøver ikke å være, men er eventuelt, formulert med ett eller flere stoffer som for øyeblikket anvendes til å forebygge eller behandle den aktuelle forstyrrelsen. Den virkningsfulle mengden av slike andre stoffer avhenger av mengden av antistoff eller immunkonjugat i
- 20 formuleringen, typen av forstyrrelse eller behandling og andre faktorer behandlet ovenfor. Disse anvendes alminneligvis i samme doser og med tilførselsruter som beskrevet heri, eller ca. fra 1 til 99 % av dosene beskrevet heri, eller i enhver dose og ved enhver rute som er empirisk/klinisk bestemt til å være hensiktsmessig.
- 25 For forebygging eller behandling av sykdom vil den egnede dosen av et antistoff eller immunkonjugat ifølge oppfinnelsen (ved anvendelse alene eller i kombinasjon med ett eller flere andre ytterligere terapeutiske stoffer, slik som kjemoterapeutiske stoffer) avhenge av typen av sykdom som skal behandles,
- 30 typen av antistoff eller immunkonjugat, sykdommens alvorlighetsgrad og progresjon, enten antistoffet eller immunkonjugatet tilføres for forebyggende eller terapeutiske formål, tidligere behandling, pasientens kliniske historie og respons på antistoffet eller immunkonjugatet og den behandlende legens skjønn. Antistoffet eller immunkonjugatet tilføres passende til pasienten på én gang eller
- 35 over en serie av behandlinger. Avhengig av sykdommens type og alvorlighetsgrad kan ca. 1 µg/kg til 100 mg/kg (f.eks. 0,1 mg/kg-20 mg/kg) av

antistoff eller immunkonjugat være en innledende kandidatdose for tilførsel til pasienten, enten for eksempel ved én eller flere separate tilførsler, eller ved kontinuerlig infusjon. Én typisk daglig dose kan være fra ca. 1 µg/kg til 100 mg/kg eller mer, avhengig av faktorene nevnt ovenfor. For gjentatt tilførsel

5 over flere dager eller lenger ville behandlingen, avhengig av tilstanden, alminneligvis opprettholdes til en ønsket suppresjon av sykdomssymptomene forekommer. Et eksempel på en dose av antistoffet eller immunkonjugatet ville være i området fra ca. 0,05 mg/kg til ca. 10 mg/kg. Én eller flere doser på ca. 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg eller 10 mg/kg (eller en hvilken som helst

10 kombinasjon derav) av antistoff eller immunkonjugat kan således tilføres til pasienten. Slike doser kan tilføres intermitterende, f.eks. hver uke eller hver tredje uke (f.eks. slik at pasienten får fra ca. to til ca. tjue, eller f.eks. ca. seks doser av antistoffet eller immunkonjugatet). En innledende høyere dose, etterfulgt av én eller flere lavere doser, kan tilføres. Et eksempel på et

15 doseregime omfatter tilførsel av en innledende dose på ca. 4 mg/kg, etterfulgt av en ukentlig vedlikeholdsdose på ca. 2 mg/kg av antistoffet. Men andre doseregimer kan være nyttige. Progresjonen i denne behandlingen kan enkelt overvåkes ved klassiske teknikker og assayer.

C. Aktivitetsassayer

20

Anti-CD79b-antistoffer og immunkonjugater ifølge oppfinnelsen kan være karakterisert ved deres fysiske/kjemiske egenskaper og/eller biologiske aktiviteter ved en rekke assayer kjent i teknikken.

1. Aktivitetsassayer

25

I et aspekt stilles assayer til rådighet for identifikasjon av anti-CD79b-antistoffer eller immunkonjugater derav med biologisk aktivitet. Biologisk aktivitet kan omfatte for eksempel evnen til å inhibere cellevekst eller -proliferasjon (f.eks. "celledepende" aktivitet), eller evnen til å indusere celledød, herunder

30 programmert celledød (apoptose). Antistoffer eller immunkonjugater med slik biologisk aktivitet in vivo og/eller in vitro er også stilt til rådighet.

I visse utførelsesformer testes et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat derav for dets evne til å inhibere cellevekst eller -proliferasjon in vitro. Assayer for inhibering av cellevekst eller -proliferasjon er velkjent i teknikken. Visse assayer for celleproliferasjon, eksemplifisert ved de "celledepende" assayene

5 beskrevet heri, måler cellelevedyktighet. Ett slikt assay er CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, som er kommersielt tilgjengelig fra Promega (Madison, WI). Dette assayet bestemmer antallet levedyktige celler i kultur basert på kvantitering av tilstedeværende ATP, som er en indikasjon på

10 metabolsk aktive celler. Se Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81–88, US-patent nr. 6 602 677. Assayet kan utføres i 96- eller 384-brønnersformat, hvilket gjør det egnet til automatisk screening med høy gjennomstrømning (HTS). Se Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398–404. Assayprosedyren

15 omfatter tilsetning av et enkelt reagens (CellTiter-Glo®-reagens) direkte til dyrkede celler. Dette resulterer i cellelysering og dannelse av et luminescerende signal fremstilt ved en luciferasereaksjon. Det luminescerende signal er proporsjonalt med mengden av tilstedeværende ATP, som er direkte proporsjonal med antallet levedyktige celler i kulturen. Data kan registreres med

20 luminometer eller CCD-kameraopptager. Luminescenssignalet uttrykkes som relative lysenheter (RLU).

Et annet assay for celleproliferasjon er "MTT"-assayet, et kolorimetrisk assay som måler oksidering av 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid til formazan ved mitokondrial reduktase. I likhet med CellTiter-Glo™-assayet angir dette assayet antallet metabolsk aktive celler i en cellekultur. Se for

25 eksempel Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55–63, og Zhang et al. (2005) Kreft Res. 65:3877–3882.

I et aspekt testes et anti-CD79b-antistoff for sin evne til å indusere celledød in vitro. Assayer for induksjon av celledød er velkjent i teknikken. I noen

30 utførelsesformer måler slike assayer for eksempel tap av membranintegritet som angitt ved opptak av propidiumjodid (PI), trypanblå (se Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1–11) eller 7AAD. I et eksempel på PI-opptaksassay dyrkes celler i Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) supplert med 10 % varmeinaktivert FBS (Hyclone) og 2 mM L-glutamin. Assayet utføres

35 således under fravær av komplement- og immuneffektorceller. Cellene kimes ved en densitet på 3×10^6 per skive i 100 x 20 mm skiver og får binde over

natten. Mediet fjernes og utbyttes med ferskt medium alene eller medium inneholdende en rekke konsentrasjoner av antistoffet eller immunkonjugatet. Cellene inkuberes i en 3-dages tidsperiode. Etter behandling skylles monosjikt med PBS og løsnes ved trypsinisering. Cellene sentrifugeres deretter ved
5 1200 rpm i 5 minutter ved 4 °C, pelleten resuspenderes i 3 ml kald Ca^{2+} -bindingsbuffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) og alikvoteres til 35 mm silkorkede 12 x 75 mm glass (1 ml per glass, 3 glass per behandlingsgruppe) for fjerning av celleklumper. Glassene får deretter PI (10 µg/ml). Prøvene analyseres ved hjelp av et FACSCAN™-strømningscytometer
10 og FACSCONVERT™ CellQuest-programvare (Becton Dickinson). Antistoffer eller immunkonjugater som induserer statistisk signifikante nivåer av celledød som bestemt ved PI-opptak, identifiseres således.

I et aspekt testes et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat for sin evne til å
15 indusere apoptose (programmert celledød) in vitro. Et eksempel på et assay for antistoffer eller immunkonjugater som induserer apoptose, er et anneksinbindingsassay. I et eksempel på et anneksinbindingsassay dyrkes og kimes celler i skiver som drøftet i foregående avsnitt. Mediet fjernes og utbyttes med ferskt medium alene eller medium inneholdende 0,001 til 10 µg/ml av antistoffet eller immunkonjugatet. Etter en tre dagers inkuberingsperiode skylles
20 monosjikter med PBS og løsnes ved trypsinisering. Cellene sentrifugeres deretter, resuspenderes i Ca^{2+} -bindingsbuffer og alikvoteres i glass som drøftet i foregående avsnitt. Glassene får deretter merket anneksin (f.eks. anneksin V-FITC) (1 µg/ml). Prøvene analyseres ved hjelp av et FACSCAN™-
25 strømningscytometer og FACSCONVERT™ CellQuest-programvare (BD Biosciences). Antistoffer eller immunkonjugater som induserer statistisk signifikante nivåer av anneksinbinding i forhold til kontroll, identifiseres således. Et annet eksempel på et assay for antistoffer eller immunkonjugater som induserer apoptose, er et kolorimetrisk histon-DNA ELISA-assay for påvisning av
30 internukleosomal nedbryting av genomisk DNA. Et slikt assay kan utføres ved hjelp av for eksempel ELISA-analysesettet for påvisning av celledød (Roche, Palo Alto, CA).

Celler til anvendelse i noen av ovennevnte in vitro-assayer omfatter celler eller
35 cellelinjer som naturlig uttrykker CD79b, eller som konstrueres til å uttrykke CD79b. Slike celler omfatter tumorceller som overuttrykker CD79b i forhold til

normale celler av samme vevsopprinnelse. Slike celler omfatter også cellelinjer (omfattende tumorcellelinjer) som uttrykker CD79b, og cellelinjer som ikke normalt uttrykker CD79b, men transfekteres med nukleinsyre som koder for CD79b.

5

I et aspekt testes et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat derav for sin evne til å inhibere cellevekst eller -proliferasjon in vivo. I visse utførelsesformer testes et anti-CD79b-antistoff eller immunkonjugat derav for sin evne til å inhibere tumorvekst in vivo. In vivo-modellsystemer, slik som xenograftmodeller, kan anvendes til slik testing. I et eksempel på et xenograftsystem tilføres humane tumorceller til et egnet immunkompromittert ikke-humant dyr, f.eks. en SCID-mus. Et antistoff eller immunkonjugat ifølge oppfinnelsen tilføres til dyret. Antistoffets eller immunkonjugatets evne til å inhibere eller redusere tumorvekst, måles. I visse utførelsesformer for ovennevnte xenograftsystem er de humane tumorcellene tumorceller fra en human pasient. Slike celler som er nyttige for fremstilling av xenograftmodeller, omfatter humane leukemi- og lymfomcellelinjer, som omfatter blant annet BJAB-luc-cellene (en EBV-negativ Burkitts lymfom-cellelinje transfektert med luciferasereporterogenet), Ramos-celler (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), SuDHL-4-celler (DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495), DoHH2-celler (se Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991) og Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8:1385-1391 (1994)), Granta-519-celler (se Jadayel, D.M. et al, Leukemia 11(1):64-72 (1997)). I visse utførelsesformer tilføres de humane tumorcellene til et passende immunkompromittert ikke-humant dyr ved subkutan injeksjon eller ved transplantasjon til et egnet sted, slik som en brystfettpute.

25

2. Bindingassayer og andre assayer

I et aspekt testes et anti-CD79b-antistoff for sin antigenbindingsaktivitet. I visse utførelsesformer testes et anti-CD79b-antistoff for eksempel for sin evne til å binde til CD79b uttrykt på overflaten av en celle. Et FACS-assay kan anvendes til slik testing.

30

I et aspekt kan kompetitive assayer anvendes til å identifisere et monoklonalt antistoff som konkurrerer med murint MA79b antistoff, humanisert MA79b.v17-antistoff og/eller humanisert MA79b.v18- og/eller humanisert MA79b.v28-

35

og/eller humanisert MA79b.v32-antistoff for binding til CD79b. I visse utførelsesformer binder et slikt kompetitivt antistoff til samme epitop (f.eks. en lineær eller konformasjonell epitop) som er bundet av murint MA79b-antistoff, humanisert MA79bv.17-antistoff og/eller humanisert MA79b.v18-antistoff

5 og/eller humanisert MA79b.v28 og/eller humanisert MA79b.v32. Eksempler på kompetitive assayer omfatter blant annet rutineassayer slik som dem stilt til rådighet i Harlow og Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Detaljerte eksempler på fremgangsmåter for kartlegging av en epitop hvortil et antistoff binder, er stilt til

10 rådighet i Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," i *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). To antistoffer sies å binde til samme epitop hvis hver enkelt blokkerer binding av den andre med 50 % eller mer.

15 I et eksempel på et kompetitivt assay inkuberes immobilisert CD79b i en løsning omfattende et første merket antistoff som binder til CD79b (f.eks. murint MA79b-antistoff, humanisert MA79b.v17-antistoff og/eller humanisert MA79b.v18-antistoff og/eller humanisert MA79b.v28 og/eller humanisert MA79b.v32) og et andre umerket antistoff som testes for sin evne til å

20 konkurrere med det første antistoffet for binding til CD79b. Det andre antistoffet kan være til stede i en hybridomsupernatant. Som en kontroll inkuberes immobilisert CD79b i en løsning omfattende det første merkede antistoffet, men ikke det andre merkede antistoffet. Etter inkubering under betingelser som gir mulighet for binding av det første antistoffet til CD79b, fjernes overskudd av

25 ubundet antistoff, og mengden av markør assosiert med immobilisert CD79b måles. Hvis mengden av markør assosiert med immobilisert CD79b er vesentlig redusert i testprøve i forhold til kontrollprøven, angir det at det andre antistoffet konkurrerer med det første antistoffet for binding til CD79b. I visse utførelsesformer er immobilisert CD79b til stede på overflaten av en celle eller i

30 en membranfremstilling oppnådd fra en celle som uttrykker CD79b på sin overflate.

I et aspekt kan rensede anti-CD79b-antistoffer videre være karakterisert ved en serie assayer omfattende blant annet N-terminal sekvensering,

35 aminosyreanalyse, høytrykksvæskeskromatografi (HPLC) med ikke-denaturerende

størrelseseksklusjon, massespektrometri, ionbyttekromatografi og papainnedbryting.

- I en utførelsesform behandler oppfinnelsen et endret antistoff som har noen, men ikke alle effektorfunksjonene, hvilket gjør det til en ønsket kandidat for mange anvendelser hvor antistoffets halveringstid in vivo er viktig, selv om visse effektorfunksjoner (slik som komplement og ADCC) er unødvendige eller skadelige. I visse utførelsesformer måles antistoffets Fc-aktiviteter for å sikre at bare de ønskede egenskapene opprettholdes. Cytotoksisitetsassayer in vitro og/eller in vivo kan utføres for å bekrefte reduksjonen/deplesjon av CDC- og/eller ADCC-aktiviteter. Assayer for Fc-reseptorbinding (FcR) kan for eksempel utføres for å sikre at antistoffet mangler FcγR-binding (og således sannsynligvis mangler ADCC-aktivitet), men beholder FcRn-bindingsevne. Primærcellene for mediering av ADCC, NK-celler, uttrykker bare FcγRIII, mens monocytter uttrykker FcγRI, FcγRII og FcγRIII. FcR-ekspresjon på hematopoietiske celler er oppsummert i tabell 3 på side 464 i Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457–92 (1991). Et eksempel på et assay in vitro for å vurdere ADCC-aktivitet for et molekul av interesse er beskrevet i US-patent nr. 5 500 362 eller 5 821 337. Nyttige effektorceller for slike assayer omfatter mononukleære celler i perifert blod (PBMC) og naturlige drapsceller (NK). ADCC-aktivitet i molekylet av interesse kan eventuelt eller i tillegg vurderes in vivo, f.eks. i en dyremodell, slik som den som er beskrevet i Clynes et al. PNAS (USA) 95:652–656 (1998). Clq-bindingsassayer kan også utføres for å bekrefte at antistoffet ikke kan binde Clq og således mangler CDC-aktivitet. For å vurdere komplementaktivering kan et CDC-assay, f.eks. som beskrevet i Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996), utføres. Bestemmelse av FcRn-binding og clearance/halveringstid in vivo kan også utføres ved hjelp av fremgangsmåter kjent i teknikken.
- Følgende eksempler er bare illustrerende og ikke beregnet på å begrense omfanget av den foreliggende oppfinnelse på noen måte.

EKSEMPLER

- De kommersielt tilgjengelige reagensene nevnt i eksemplene ble anvendt i samsvar med produsentens bruksanvisning, med mindre annet er angitt.

Antistoffene anvendt i eksemplene omfatter kommersielt tilgjengelige antistoffer og omfatter blant annet anti-CD79b (antistoff kjøpt av Biomeda (Foster City, CA) eller BD Bioscience (San Diego, CA) eller Ancell (Bayport, MN)), anti-CD79b (dannet av hybridomer deponert hos ATCC som HB11413 den 20. juli 1993) og

5 kimære anti-CD79b-antistoffer (omfattende variable domener fra antistoffer dannet av hybridomer deponert hos ATCC som HB11413 20. juli 1993). Kilden til disse cellene identifisert i følgende eksempler, og i hele patentteksten, ved ATCC-registreringsnumre, er American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EKSEMPEL 1: Dannelse av humanisert anti-CD79b-antistoff

10

Enhetsnumrene er ifølge Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Det anvendes aminosyreforkortelser på én bokstav. DNA-degenerasjoner er representert med IUB-koden (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).

15

A. Poding av humanisert anti-CD79b-antistoff

En rekke humaniserte anti-CD79b-antistoffer ble dannet. VL- og VH-domenene

20 fra murint MA79b-antistoff (MA79b) (Roswell Park Cancer Institute; Okazaki et al., Blood, 81:84–94 (1993)) ble sammenstilt med de humane kappa I VL-konsensus- (huKI) og humane undergruppe III VH-konsensusdomener (huIII). For å fremstille HVR-podingen ble VH-akseptorstrukturen, som skiller seg fra det humane undergruppe III VH-konsensusdomenet i de 3 posisjonene R71A, N73T

25 og L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)) anvendt. Hypervariable regioner fra murint MA79b (MA79b) ble konstruert inn i den humane akseptorkonsensusstrukturen for å danne en direkte HVR-poding av MA79b (heri betegnet "MA79b-poding" eller "MA79b-podet 'humanisert' antistoff" eller "huMA79b-poding"). I VL-domenet ble følgende regioner podet til den

30 humane konsensusakseptoren: posisjon 24–34 (L1), 50–56 (L2) og 89–97 (L3) (figur 7A–B). I VH-domenet ble posisjon 26–35 (H1), 49–65 (H2) og 93–102 (H3) podet (figur 8A–B). MacCallum et al. (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262: 732–745 (1996)) analyserte antistoff- og antigenkompleksskrySTALLstrukturer og

oppdaget ved posisjon 49, 93 og 94 av den tunge kjeden er del av kontaktregionen og således omfattet av definisjonen av HVR-H2 og HVR-H3 ved humanisering av antistoffer.

- 5 Den direkte podingsvarianten (huMA79b-graft) ble dannet ved Kunkel-mutagenese som både Fab angitt på fag og som et IgG ved hjelp av et eget oligonukleotid for hver hypervariabel region. Riktige kloner ble vurdert ved DNA-sekvensering.

B. Podingsvarianter av humanisert anti-CD79b-antistoff

10

Podingsvarianter av anti-CD79b-antistoff som omfattet mutasjonelt mangfold i de hypervariable regionene av det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet, ble dannet ved hjelp av fagbiblioteker. Podingsvarianter av anti-CD79b-antistoff omfattet enten en endring i en enkelt posisjon i HVR-ene (figur 9) eller endringer i flere posisjoner i HVR-ene (figur 10).

15

C. Fagseleksjon

For fagseleksjon ble det ekstracellulære domenet av CD79b (huCD79b_{ecd}) (2 µg/ml) immobilisert i PBS på MaxiSorp-mikrotiterplater (Nunc) over natten ved 4 °C. Platene ble blokkert i minst 1 h ved hjelp av Casein Blocker (Pierce). Fag ble høstet fra kultursupernatanten og suspendert i PBS inneholdende 0,5 % BSA og 0,05 % Tween 20 (PBSBT). Etter tilsetning av fagbiblioteket og fagseleksjon i 2 h ble mikrotiterbrønnene skylt omhyggelig med PBS inneholdende 0,05 % Tween 20 (PBST) for å fjerne ubundet fag, og bundet fag ble eluert ved inkubering av brønnene med 100 mM HCl i 30 min. Seleksjonsstrengheten kan økes under suksessive seleksjonsrunder ved økning av antallet skyllinger med PBST eller ved inkubering med løselig huCD79b_{ecd} i økte tidsrom før eluering.

20

25

Eluert fag ble nøytralisert med 1 M Tris, pH 8 og amplifisert ved hjelp av XL1-blåceller og M13/KO7-hjelperfag og dyrket over natten ved 37 °C i 2YT, 50 µg/ml karbenacillin. Titerne av fag eluert fra en målinneholdende brønn ble sammenlignet med titere av fag utvunnet fra en ikke-målinneholdende brønn for å vurdere anrikelse.

30

D. Fab-produksjon og IgG-produksjon

For å uttrykke Fab-protein for affinitetsmålinger ble et stoppkodon tilført mellom den tunge kjeden og g3 i fagvisningsvektoren. Kloner ble omdannet til E. coli
 5 34B8-celler og dyrket i Complete C.R.A.P.-medium ved 30 °C (Presta et al. Cancer Res. 57: 4593–4599 (1997)). Cellene ble høstet ved sentrifugering, suspendert i PBS, 100 µM PMSF, 100 µM benzamidin, 2,4 mM EDTA og brutt opp ved hjelp av et Mikrofluidizer-apparat. Fab ble rensset med protein G-affinitetskromatografi.

10

I sammenheng med screening ble IgG-varianter innledningsvis fremstilt i 293 celler. Vektorer som koder for VL og VH (25 µg), ble transfektert til 293 celler ved hjelp av FuGene-systemet. 500 µl FuGene ble blandet med 4,5 ml DMEM-medium inneholdende ingen FBS og inkubert ved romtemperatur i 5 min. Hver
 15 kjede (25 µg) ble tilsatt til denne blandingen og inkubert ved romtemperatur i 20 min og deretter overført til en flaske for transfeksjon over natten ved 37 °C i 5 % CO₂. Neste dag ble mediet inneholdende transfeksjonsblandingen fjernet og utbyttet med 23 ml PS04 medium med 0,1 ml/l sporelementer (A0934) og 10 mg/l insulin (A0940). Cellene ble inkubert i ytterligere 5 dager hvorefter
 20 mediet ble høstet ved 1000 rpm i 5 min og steriltfiltrert ved hjelp av et 0,22 µm lavproteinbindende filter. Prøvene kunne lagres ved 4 °C etter tilsetning av 2,5 ml 0,1 % PMSF for hver 125. ml medium.

E. Affinitetsbestemmelse (Biacore-analyse)

25 For affinitetsbestemmelse av MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter ble det ekstracellulære domenet av humant CD79b (huCD79b_{ecd}) uttrykt bare i CHO-celler eller som en Fc-kondensering (huCD79b_{ecd}-Fc) og rensset ved klassiske midler. I tillegg ble et 16-aminosyrepeptid (ARSEDRYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 16) inneholdende epitopen for MA79b syntetisert ved klassiske midler.

30

Karakterisering av epitopen for MA79b-antistoff (merket som "testpeptid" på figur 19) ble tidligere beskrevet i US-søknad nr. 11/462 336, inngitt 3. august 2006. Epitopen for MA79b var lokalisert i den ekstracellulære peptidregionen distalt for det transmembrane domenet og fantes i fulllengdeform og trunkert

form av humant CD79b (Cragg, Blood, 100(9): 3068–76 (2002)), som er beskrevet i normale og ondartede B-celler (Hashimoto, S. et al., Mol. Immunol., 32(9): 651–9 (1995); Alfarano et al., Blood, 93(7): 2327–35 (1999)). Den trunkerte formen av CD79b mangler hele det ekstracellulære Ig-lignende domenet (det ekstracellulære Ig-lignende domenet som ikke er til stede i den spaltede, trunkerte formen av CD79b, er innrammet på figur 19).

Binding av Fab- og IgG-varianter av MA79b, det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet eller de MA79b-podede "humaniserte" antistoffvariantene til immobilisert huCD79b_{ecd} eller huCD79b-Fc eller 16-aminosyrepeptidet inneholdende epitopen for MA79b ble målt ved overflateplasmaresonans. Affinitetsbestemmelser ble utført ved overflateplasmonresonans ved hjelp av et BIAcore™-2000. Antigenet, huCD79b_{ecd} eller huCD79b-Fc ble immobilisert (ca. 50–200 RU) i 10 mM natriumacetat pH 4,8 på en CM5-sensorbrikke. På grunn av en stor aviditetsvirkning var affinitetsmålingene følsomme for mengden av immobilisert huCD79b_{ecd}. Affinitet, bestemt for prøver analysert på forskjellige dager, ble derfor normalisert til MA79b som ble analysert i tillegg som en standard. I forsøk som målte binding til 16-aminosyrepeptidet inneholdende epitopen for MA79b (ARSEDYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 16), ble det biotinylerede peptidet innfanget (ca. 20 RU) på en streptavidinbelagt sensorbrikke. Renset MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant (som Fab eller IgG) (en 2 ganger seriefortynning på 0,5 til 1000 nM i PBST) ble injisert ved en strømningshastighet på 30 µl/min. Hver prøve ble analysert med 4-minutters assosiasjon og 10-minutters disassosiasjon. Etter hver injeksjon ble brikken regenerert ved hjelp av 10 mM glycin pH 1,7.

Bindingsresponsen ble korrigeret ved subtraksjon av en kontrollstrømningscelle fra strømningsceller av MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant (som Fab eller IgG). En Langmuir-modell på 1 : 1 med samtidig tilpasning av k_{on} og k_{off} ble anvendt til kinetisk analyse.

F. Bindingsanalyse (FACS-analyse)

For å bestemme videre binding av Fab-variantene av MA79b-podet "humanisert" antistoff eller antistoffvarianter ble binding av Fab- og/eller IgG-varianter til DoHH-2-celler analysert ved hjelp av FACS-analyse. Binding av MA79b-podede

"humaniserte" antistoffvarianter til BJAB-luciferaseceller ble videre analysert ved hjelp av FACS-analyse.

5 For FACS-analyse av Fab-varianter av MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter (MA79b-podet "humanisert" antistoff (IgG-versjon anvendt som kontroll)) ble DoHH-2-celler (1×10^6 i 100 μ l volum) først inkubert med eller uten 1 μ g av originalt monoklonalt anti-CD79b-antistoff fra mus (MA79b) i 30 minutter, før tilsetning av 1 μ g individuell Fab-variant (eller kontrollantistoff).
 10 PE-konjugert anti-humant Ig fra mus, kappa-lettkjede (klon G20-193, BD Biosciences, San Diego, CA) ble anvendt som sekundært påvisende antistoff, siden alle Fab-variantene bærer kappa-lettkjede, og DoHH-2-celler ikke uttrykker kappa-lettkjede på celleoverflaten.

For ytterligere FACS-analyse av IgG-varianter av MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter (IgG-versjon av chMA79b anvendt som kontroll) ble 1,0 μ g, 0,1 μ g eller 0,01 μ g antistoff titrert per million celler av BJAB-luciferaseceller. PE-konjugert anti-humant Ig fra mus ble anvendt som sekundært påvisende antistoff.

G. Affinitetsbestemmelse (Scatchard-analyse)

20 For å bestemme videre binding av IgG-variantene med endringer i HVR-L2 og HVR-H3 (huMA79b L2/H3) ble binding av joderte IgG-varianter av BJAB-celler som uttrykker humant CD79b og cynomolog-CD79b analysert, og Scatchard-analyse ble utført.

25 For Scatchard-analyse ble 0,5 nM I^{125} -merket MA79b eller huMA79b L2/H3 stilt opp mot henholdsvis umerket MA79b eller huMA79b L2/H3 fra 50 til 0,02 nM (12-trinns 1 : 2 seriefortynning) under nærvær av en transfekt BJAB-linje som stabilt uttrykker cynomolog-CD79b og endogent humant CD79b. Etter fire
 30 timers inkubering ved 4 °C ble cellene skyllet og cellepelletantall avlest med en gammateller (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Alle poenger skjedde tre ganger og ble talt i 10 minutter. Gjennomsnittlig CPM ble anvendt til Kd-beregning ved hjelp av New Ligand-programmet (Genentech, South San Francisco, CA).

Resultater og drøftelse

A. Resultater av dannelsen av humanisert anti-CD79b-antistoff

- 5 Den humane akseptorstrukturen anvendt for dannelsen av humanisert anti-CD79b-antistoff omfatter det humane kappa I VL-konsensusdomenet og en variant av det humane undergruppe III VH-konsensusdomenet. VH-domenevarianten har 3 endringer fra den humane konsensus: R71A, N73T og L78A. VL- og VH-domenene av MA79b ble sammenstilt med de humane kappa I-
10 og undergruppe III-domenene; hver HVR ble identifisert og deretter podet til den humane akseptorstrukturen for å danne en HVR-poding som kunne angis som en Fab på fag (figur 7 og 8).

- Fag som viser MA79b-podingen som en Fab bundet til immobilisert huCD79b_{ecd} (data ikke angitt). Men når huMA79b-podingssekvensen ble uttrykt som et IgG, tydet FACS-analysen av dens affinitet for huCD79b_{ecd} på at bindingsaffiniteten var redusert med over 100 ganger (data ikke angitt), og Biacore-analyse tydet på et tap på over 50 ganger (figur 11).

1. CDR-reparasjon

- 20 MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter som kunne binde til immobilisert huCD79b_{ecd} med følgende sekvensendringer, ble identifisert.

- Bare sekvensendringer som var rettet mot HVR-er i VL, ble observert i
25 bibliotekene inneholdende enkle posisjonsendringer og er angitt på figur 9 (for L1-mutasjoner: Q27K (SEQ ID NO: 17; SPL-2-mutasjon), (for L2-mutasjoner: L54R (SEQ ID NO: 18), E55K (SEQ ID NO: 19)), og (for L3-mutasjoner: E93S (SEQ ID NO: 20; SPL-5 mutasjon), E93K (SEQ ID NO: 21)).

- 30 Bare sekvensendringer som var rettet mot HVR-er i L2, L3, H1 og H3, ble observert i bibliotekene inneholdende flere posisjonsendringer og er angitt på figur 10 (for L2-mutasjoner: S52R, N53K, E55G og S56R (SEQ ID NO: 22; L2-2-

mutasjon); N53R (SEQ ID NO: 23); S52R, N53K, E55G og S56N (SEQ ID NO: 24); S52R N53K, E55K og S56R (SEQ ID NO: 25); S52R, N53Y, E55K og S56R (SEQ ID NO: 26; L2-29-mutasjon); S52R, N53K og E55K (SEQ ID NO: 27); S52R, N53K og E55A (SEQ ID NO: 28); S52G, N53I, E55A og S56R (SEQ ID NO: 29); S52R, N53K, E55R (SEQ ID NO: 30); S52R, N53K og E55G (SEQ ID NO: 31; L2-38-mutasjon); S52R, N53H, E55K og S56R (SEQ ID NO: 32); A51S, S52R, N53Y, E55S og S56R (SEQ ID NO: 33); A51G, N53K, E55L og S56R (SEQ ID NO: 34); L54R og E55K (SEQ ID NO: 35); N53K og E55G (SEQ ID NO: 36); S52R, N53Y, E55R og S56R (SEQ ID NO: 37); S52R, N53R, E55R og S56T (SEQ ID NO: 38); S52R, N53R, E55G og S56R (SEQ ID NO: 39); S52R, N53Q, L54R, E55K og S56R (SEQ ID NO: 40); S52R, N53K, E55L og S56R (SEQ ID NO: 41); S52R, N53K, E55K og S56N (SEQ ID NO: 42); S52R, N53K, E55G og S56T (SEQ ID NO: 43); S52R, N53K, E55G og S56G (SEQ ID NO: 44); og S52R, N53K, E55A og S56R (SEQ ID NO: 45)), (for L3-mutasjoner: E93A (SEQ ID NO: 46); E93Q (SEQ ID NO: 47); ingen mutasjon (SEQ ID NO: 48); E93D (SEQ ID NO: 49); E93L (SEQ ID NO: 50); Q89N, Q90N, E93G og T97N (SEQ ID NO: 51); Q90P, S91D, D94A og L96R (SEQ ID NO: 52); Q89D, S91R og E93A (SEQ ID NO: 53)), (for H1-mutasjoner: T28P, S30T, S31R og E35S (SEQ ID NO: 54); T28P, S30R og E35Q (SEQ ID NO: 55); T28P, S30T og E35N (SEQ ID NO: 56); T28P, S30T, S31R og E36N (SEQ ID NO: 57; H1-6-mutasjon)); S30N, S31R og E35N (SEQ ID NO: 58); T28S og S30K (SEQ ID NO: 59); G26P, T28S, F29L, S30C, S31T, W33F og E35D (SEQ ID NO: 60); T28Y og S30T (SEQ ID NO: 61); T28P, S30G, S31R, I34V og E35N (SEQ ID NO: 62); S30K og S31K (SEQ ID NO: 63); T28P, S30T og E35Q (SEQ ID NO: 64); T28P, S30R og S31R (SEQ ID NO: 65); T28P, F29V, S30G, S31R og E35S (SEQ ID NO: 66); T28P, S30N, S31R og E35N (SEQ ID NO: 67; H1-1-mutasjon); T28G, S30T og E35S (SEQ ID NO: 68); S30T, I34L og E35S (SEQ ID NO: 69); S30T (SEQ ID NO: 70); S31G og E35N (SEQ ID NO: 71); S30R, S31R og E35N (SEQ ID NO: 72); T28S, S30R og E35N (SEQ ID NO: 73); T28S, S30R, S31R og E35N (SEQ ID NO: 74); T28S, S30R og S31R (SEQ ID NO: 75); T28S, S30P, I34L og E35Q (SEQ ID NO: 76); T28P, S30T og S31R (SEQ ID NO: 77); T28P og S31G (SEQ ID NO: 78); T28P, S30R og E35S (SEQ ID NO: 79); T28P, S30R og E35N (SEQ ID NO: 80); T28P, S30R og S31G (SEQ ID NO: 81); T28P, S30N og S31R (SEQ ID NO: 82); T28P, S30N, S31G og E35N (SEQ ID NO: 83); T28N, F29V, I34L og E35S (SEQ ID NO: 84); Y27F, T28P, S30T og E35S (SEQ ID NO: 85); og Y27F, T28P, S30N, S31R og E35N (SEQ ID NO: 86)) og (for H3-mutasjoner: V98I og F100L (SEQ ID NO: 87);

H3-12-mutasjon); ingen mutasjon (SEQ ID NO: 88); Y99K og F100L (SEQ ID NO: 89); F100L (SEQ ID NO: 90); V98I (SEQ ID NO: 91); V98F, Y99C og F100L (SEQ ID NO: 92); F100L (SEQ ID NO: 93); V98I, Y99R og F100L (SEQ ID NO: 94; H3-10-mutasjon); V98I, Y99K og F100L (SEQ ID NO: 95); V98I og Y99R (SEQ ID NO: 96); V98I (SEQ ID NO: 97); D101S (SEQ ID NO: 98); Y99V og F100L (SEQ ID NO: 99); Y99R og F100L (SEQ ID NO: 100); Y99R (SEQ ID NO: 101); Y99F og F100L (SEQ ID NO: 102); V98I og F100L (SEQ ID NO: 103); V98I (SEQ ID NO: 104); V96R, Y99C og F100L (SEQ ID NO: 105); og V96I (SEQ ID NO: 106)).

10

Utvalgte kloner ble reformatert som Fab for FACS-analyse og som IgG for videre Biacore- og Scatchard-analyse.

a. Affinitetsbestemmelse (Biacore-analyse)

15 Som angitt på figur 11, som viser Biacore-analyse, identifiserte denne CDR-reparasjonsmetoden mange enkeltstående sekvensendringer som forbedrer det MA79b-podede "humaniserte" antistoffets affinitet. Overflateplasmonresonansanalysene viste at selv om ingen av de testede variantene med enkle HVR-endringer hadde en affinitet lik MA79b, førte
20 kombinasjonen av endringer identifisert i HVR-L2 og HVR-H3 (MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant L2/H3, heri også betegnet huMA79b L2/H3) til en variant med lignende affinitet (figur 11) som MA79b ved binding til immobilisert huCD79b_{ecd} eller huCD79b_{ecd}-Fc eller 16-aminosyrepeptidet inneholdende epitopen for MA79b som bestemt ved Biacore-analyse.

25

Analyse av monomerisk binding (Fab) versus dimerisk binding (IgG) av MA79b til antigen (huCD79b_{ecd}-Fc) (figur 11, rad 1, jf. Fab- med IgG-kolonner) antyder at en 100 ganger aviditetskomponent i MA79b kan mangle i de affinitetsforbedrede variantene. I MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant L2-2 (heri også
30 betegnet huMA79b L2-2) som viser en 5 ganger forbedring i monomerisk binding sammenlignet med MA79b (figur 11, rad 1 og 3, jf. Fab-kolonner), erverves ingen tilsynelatende affinitet spesifikt ved reformatering av huMA79b L2-2 som et IgG) (figur 11, rad 4, jf. Fab- med IgG-kolonner). Det opprinnelige MA79b HVR-podede "humaniserte" antistoffet (huMA79b-poding) viser i tillegg tap av
35 denne aviditetskomponenten i binding (figur 11, rad 2, jf. Fab- med IgG-

kolonner). Evnen til å forsterke binding gjennom aviditet kan være ønskelig ved binding av celleoverflateantigener.

b. Affinitetsbestemmelse (Scatchard-analyse)

- 5 Som vurdert ved Scatchard-analyse identifiserte denne CDR-reparasjonsmetoden mange enkeltstående sekvensendringer som forbedret det MA79b-podede "humaniserte" antistoffets affinitet. Cellebindingsanalysene viste spesifikt at den MA79b- og MA79b-podede "humaniserte" antistoffvariant L2/H3 (huMA79b L2/H3) (reformatert som IgG) for binding av BJAB-celler som stabilt
10 uttrykker cynomolog-CD79b og endogent humant CD79b, var med Kd-verdier på henholdsvis 0,63 nM (MA79b; $K_d = 0,63 \pm 0,14$ nM) og 0,52 nM (huMA79b L2/H3; $K_d = 0,52 \pm 0,1$ nM) (data ikke angitt), som bestemt ved Scatchard-analyse.

c. Bindingsbestemmelse (FACS-analyse)

- 15 Som vurdert ved FACS-analyse identifiserte denne CDR-reparasjonsmetoden mange enkeltstående sekvensendringer som forbedret bindingen av det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet (huMA79b-poding) til DoHH-2-celler (data ikke angitt). FACS-analyse av Fab-varianter (L2-2-, H3-10- og H1-1-mutasjoner)
20 identifisert fra SP- og 6 SR-bibliotekene til DoHH-2-celler viste spesifikt binding av Fab-variantene og huMA79b-podingen (formatert som et IgG) til DoHH-2 celler (data ikke angitt). FACS-analyse av Fab-variantene viste videre at binding av Fab-variantene til DoHH-2-celler ble blokkert av preinkubering med murint monoklonalt anti-CD79b-antistoff (MA79b) (data ikke angitt).

25 2. Sekvensreparasjon

- HVR-sekvensendringer i HVR-L2 av huMA79b L2/H3-varianten var radikalt forskjellige fra endringer observert i enhver human kjønnselle. huMA79b L2/H3-varianten, når den var konjugert til DM1, ble observert til å være virkningsfull for
30 inhibering av tumorvekst i en *in vivo*-xenograftmodell hos mus (tabell 9). Siden analyse av monomerisk binding (Fab) versus dimerisk binding (IgG) av huMA79b

L2/H3-variant til antigen viste et tap av aviditet (figur 11), ble sekvensreparasjon utført som beskrevet nedenfor.

For å utforske sekvensposisjonenes rolle i dimerisk antigenbinding, ble det konstruert en "allsekvens"-posisjonsvariant hvor potensielt viktige murine sekvensposisjoner ble tilført til det MA79b HVR-podede "humaniserte" antistoffet (huMA79b-poding). Denne varianten (omtalt på figur 12 som "allsekvens"), hvilken mangler eventuelle HVR-endringer, hadde lignende dimerisk bindingsaffinitet til kimært MA79b-antistoff (chMA79b) (figur 12) som vurdert ved Biacore-analyse og Scatchard-analyse.

IgG-varianter, herunder murine sekvensrester ved posisjon 4 og/eller 47 (VL) og/eller posisjon 47, 48, 67, 69, 71, 73, 74, 78 og/eller 80 (VH), ble generert for å bestemme minstesettet med sekvensposisjoner som trengs for å opprettholde dimerisk binding med høy affinitet (figur 12). Murine sekvensrester er angitt på figur 7A-B (SEQ ID NO: 10) og figur 8A-B (SEQ ID NO: 14). Sekvensposisjon 47 i VL, og 75 og 80 i VH, ble påvist å være unnværlig som angitt ved MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 17 (huMA79b.v17) (figur 12, rad merket som 17).

MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 18 (MA79b.v18; figur 12, rad merket som 18), hvilken omfatter murine sekvensrester ved posisjon 4 i VL, og 48, 67, 69, 71, 73 og 78 i VH, og videre omfatter endringer i HVR-H3 (omtalt på figur 12 som "H3-10" og beskrevet ovenfor som H3-10-mutasjon), herunder V98I, Y99R og F100L, viste en ytterligere 2 ganger forbedring (figur 12, rad merket som 28) i dimerisk binding ved sammenligning med variant 17 (figur 12, rad merket som 17).

For å unngå potensielle produksjonsproblemer ble et potensielt iso-asparaginsyredannende sted (Asp-Gly) i HVR-L1 i de MA79b-podede "humaniserte" antistoffvariantene eliminert ved å omdanne D28 til Glu (glutaminsyre) (D28E; se variant 28; heri også betegnet "huMA79b.v28"; figur 12, rad merket som 28). Andre substitusjoner for stabilitet i VL i de MA79b-podede "humaniserte" antistoffvariantene ble også tolerert, omfattende D28 til Ser (serin) (D28E; se variant 32; heri også betegnet "huMA79b.v32"; figur 12, rad merket som 32).

MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 28 (huMA79b.v28; figur 12, rad merket som 28), hvilken omfatter: 1) murine sekvensrester ved posisjon 4 i VL, og 48, 67, 69, 71, 73 og 78 i VH, 2) omfatter videre endringer i HVR-H3 (omtalt på figur 12 som "H3-10" og beskrevet ovenfor som H3-10-mutasjon), herunder
 5 V98I, Y99R og F100L, og 3) omfatter også videre endringer i HVR-L1 (D28E, beskrevet ovenfor), ble karakterisert via Biacore-analyse.

MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 32 (MA79b.v32; figur 12, rad merket som 32), hvilken omfatter: 1) murine sekvensrester ved posisjon 4 i VL, og 48,
 10 67, 69, 71, 73 og 78 i VH, 2) omfatter videre endringer i HVR-H3 (omtalt på figur 12 som "H3-10" og beskrevet ovenfor som H3-10-mutasjon), omfattende V98I, Y99R og F100L, og (3) omfatter også videre endringer i HVR-L1 (D28S, beskrevet ovenfor), ble karakterisert via Biacore-analyse.

a. Affinitetsbestemmelse (Biacore-analyse)

15

Som angitt på figur 12, som viser Biacore-analyse, identifiserte denne sekvensreparasjonsmetoden mange enkeltstående sekvensendringer som forbedrer det MA79b-podede "humaniserte" antistoffets affinitet for huCD79b_{ecd}. Overflateplasmonresonansanalysene viste at en MA79b-podet "humanisert"
 20 antistoffvariant 28 (huMA79b.v28; med murine sekvensposisjoner 4 i VL, 48, 67, 69, 71, 73 og 78 i VH, og H3-10-mutasjonen i HVR-H3 (V98I, Y99R og F100L (også beskrevet ovenfor) og en D28E-mutasjon i HVR-L1 (stabilitet beskrevet ovenfor), figur 12, rad merket som 28) og en MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant (huMA79b.v32; med murine sekvensposisjoner 4 i VL, 47, 48,
 25 67, 69, 71, 73 og 78 i VH, og H3-10-mutasjonen i HVR-H3 (V98I, Y99R og F100L (også beskrevet ovenfor) og en D28S-mutasjon i HVR-L1 (stabilitet beskrevet nedenfor), figur 12, rad merket som 32) hadde affinitet tilsvarende kimært MA79b-antistoff (chMA79b) ved binding til immobilisert huCD79b_{ecd} som bestemt ved Biacore-analyse.

30 b. Affinitetsbestemmelse (Scatchard-analyse)

Som vurdert ved Scatchard-analyse, som minner om Biacore-analysen, identifiserte denne sekvensreparasjonsmetoden mange enkeltstående

sekvensendringer som forbedrer det MA79b-podede "humaniserte" antistoffets affinitet (huMA79b-poding). Cellebindingsanalysene viste at affiniteten til MA79b-, MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 28 (huMA79b.v28, se figur 12, rad merket som 28) (reformatert som IgG), og MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 32 (huMA79b.v32, se figur 12, rad merket som 32) for binding av BJAB-celler som stabilt uttrykker cynomolog-CD79b og endogent humant CD79b, var med Kd-verdier på henholdsvis 0,63 nM (MA79b; $K_d = 0,63 \pm 0,14$ nM), 0,44 nM (huMA79b.v28; $K_d = 0,44 \pm 0,04$ nM) og 0,24 nM (huMA79b.v32; $K_d = 0,24 \pm 0,02$ nM) (data ikke angitt), som bestemt ved Scatchard-analyse.

c. Bindingsbestemmelse (FACS-analyse)

Som vurdert ved FACS-analyse identifiserte denne sekvensreparasjonsmetoden mange enkeltstående sekvensendringer som forbedrer bindingen av det MA79b-podede "humaniserte" antistoffet (huMA79b-poding) til BJAB-luciferaseceller (data ikke angitt). FACS-analyse av IgG-varianter av MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter (variant huMA79b.v28 og huMA79b.v32) til BJAB-luciferaseceller viste nærmere bestemt binding til BJAB-luciferaseceller (data ikke angitt).

20 **B. Drøftelse av dannelse av humaniserte anti-CD79b-antistoffer**

Fra en poding av de 6 murine MA79b HVR-ene (definert som posisjon 24–34 (L1), 50–56 (L2), 89–97 (L3), 26–35 (H1), 49–65 (H2) og 93–102 (H3)) til human kappa I VL-konsensus og undergruppe III VH (inneholdende A71, T73 og A78) ble CDR-reparasjon anvendt til å identifisere endringer i HVR 1–6 som forbedrer bindingsaffinitet. HVR-sekvensendringer identifisert på figur 10 og 11 eller kombinasjoner av disse endringene førte til humaniserte varianter av MA79b med affiniteter lik MA79b.

30 Sekvensreparasjon ble eventuelt anvendt til å innfange dimerisk bindingsaviditet igjen ved tilføyelse av strukturposisjon 4 i VL, og 48, 67, og 69 i VH til huMA79b-podingen (som omfatter murine strukturrester i 71, 73 og 78 i VH) (figur 12; MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 17 (huMA79b.v17)). Disse

strukturmutasjonsvariantenes affinitet for huCD79b_{ecd}-antigen ble ytterligere forsterket ved tilføyelse av 3 endringer i HVR-H3: V99I, Y99R og F100L (figur 12; MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 18 (huMA79b.v18)). Et potensielt iso-aspartinsyredannende sted i HVR-L1 ble eliminert med en D28E-mutasjon (figur 12; MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 28 (huMA79b.v28)).

EKSEMPEL 2: Dannelse av anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugater (ADC-er)

10 For å teste virkningen av IgG-varianter av MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter ble MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter konjugert til legemidler, slik som DM1. Variantene konjugert til DM1 omfattet variantene med endringer i HVR-L2 og HVR-H3 (huMA79b L2/H3), huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 og huMA79b.v32.

15

Legemidlene for dannelse av antistofflegemiddelkonjugater (ADC-er) for anti-CD79b-antistoffer omfattet maytansinoid DM1 og dolastatin 10-derivatene monometylauristatin E (MMAE) og monometylauristatin F (MMAF). (US 2005/0276812; US 2005/0238649; Doronina et al., Bioconjug. Chem., 17:114–123 (2006); Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778–784 (2003); Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426–4433 (2006), hvortil det henvises, og som i sin helhet er opptatt heri). Nyttige bindingsenheter for dannelse av ADC-ene er BMPEO, SPP eller SMCC (heri også betegnet "MCC") for DM1 og MC eller MC-vc-PAB for MMAE og MMAF. For DM1 ble antistoffene bundet til tiogruppen av DM1 og gjennom ϵ -aminogruppen av lysin ved hjelp av bindingsreagenset SMCC. For DM1 ble antistoffene eventuelt bundet til DM1 gjennom e-aminogruppen av lysin ved hjelp av SPP-bindingsenheten. SPP (N-sukkinimidyl-4-(2'-pyridilditio)pentanoat) reagerer med e-aminogruppen av lysiner for å etterlate en reaktiv 2-pyridyldisulfidbindingsenhet på proteinet. Med SPP-bindingsenheter fortrenses pyridylgruppen ved omsetning med et fritt sulfhydryl (f.eks. DM1) og etterlater DM1 bundet via en reduserbar disulfidbinding. DM1 bundet via en SPP-bindingsenhet frisettes under reduserende forhold (dvs. for eksempel i celler), mens DM1 bundet via SMCC-bindingsenheten er resistent mot spalting under reduserende forhold. SMCC-DM1 ADC-er induserer videre celletoksisitet hvis ADC-et internaliseres og rettes mot lysosomet, hvilket forårsaker frisetting av

lysine-DM1, hvilket er et effektivt anti-mitotisk stoff i cellen, og når lysine-DM1 frigjøres fra cellen, er det ikke-toksisk (Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426–4433 (2006)). For MMAE og MMAF ble antistoffene bundet til MMAE eller MMAF gjennom cysteinet av maleimidokaproyl-valin-citrulin-(vc)-p-aminobenzoyloxykarbonyl (MC-vc-PAB). For MMAF ble antistoffene eventuelt bundet til MMAF gjennom cysteinet av maleimidokaproylbindingsenheden (MC). MC-vc-PAB-bindingsenheden kan spaltes av intercellulære proteaser slik som katepsin B, og når den er spaltet, frigjør den fritt legemiddel (Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778–784 (2003)), mens MC-bindingsenheden er resistent mot spalting ved intracellulære proteaser.

Antistofflegemiddelkonjugater (ADC-er) for anti-CD79b ble ved hjelp av SMCC og DM1 dannet lik prosedyren beskrevet i US 2005/0276812. Rensede anti-CD79b-antistoffer ble bufferutvekslet i en løsning inneholdende 50 mM kaliumfosfat og 2 mM EDTA, pH 7,0. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) ble oppløst i dimetylacetamid (DMA) og tilsatt til antistoffløsningen til et sluttmolforhold mellom SMCC og Ab på 10 : 1. Reaksjonen fikk fortsette i tre timer ved romtemperatur med blanding. Det SMCC-modifiserte antistoffet ble deretter rensed på en GE Healthcare HiTrap-avsaltingskolonne (G-25) ekvilibrert i 35 mM natriumcitrat med 150 mM NaCl og 2 mM EDTA, pH 6,0. DM1, oppløst i DMA, ble tilsatt til SMCC-antistoffremstillingen for å gi et molforhold mellom DM1 og antistoff på 10 : 1. Reaksjonen fikk fortsette i 4–20 h ved romtemperatur med blanding. Den DM1-modifiserte antistoffløsningen ble diafiltrert med 20 volumer av PBS for å fjerne ureagert DM1, sterilfiltrert og lagret ved 4 °C. Et utbytte på 40–60 % antistoff ble vanligvis oppnådd gjennom denne prosessen. Fremstillingen var vanligvis >95 % monomerisk som vurdert ved gelfiltrering og laserlysspredning. Siden DM1 har et absorpsjonsmaksimum på 252 nm, kan mengden av legemiddel bundet til antistoffet bestemmes ved differensialabsorpsjonsmålinger ved 252 og 280 nm. Forholdet mellom legemiddel og antistoff var vanligvis 3 til 4.

Antistofflegemiddelkonjugatene (ADC-er) for anti-CD79b-antistoffer beskrevet heri ved hjelp av SPP-DM1-bindingsenheter, kan genereres lik prosedyren beskrevet i US 2005/0276812. Rensede anti-CD79b-antistoffer bufferutvekslet til en løsning inneholdende 50 mM kaliumfosfat og 2 mM EDTA, pH 7,0 SPP (Immunogen) ble oppløst i DMA og tilsatt til antistoffløsningen for å gi et

sluttmolforhold mellom SPP og Ab på ca. 10 : 1, idet det nøyaktige forholdet avhenger av antistoffets ønskede legemiddelmengde. Et forhold på 10 : 1 vil vanligvis resultere i et forhold mellom legemiddel og antistoff på ca. 3–4. SPP fikk reagere i 3–4 timer ved romtemperatur med blanding. Det SPP-modifiserte antistoffet renses deretter på en GE Healthcare HiTrap-avsaltingskolonne (G-25) ekvilibrert i 35 mM natriumcitrat med 150 mM NaCl og 2 mM EDTA, pH 6,0 eller fosfatbufret saltløsning, pH 7,4. DM1 oppløses i DMA og tilsettes til SPP-antistoffremstillingen for å gi et molforhold mellom DM1 og antistoff på 10 : 1, hvilket resulterer i et 3–4 ganger moloverskudd over de tilgjengelige SPP-bindingsenheterne på antistoffet. Reaksjonen med DM1 fikk fortsette i 4–20 h ved romtemperatur med blanding. Den DM1-modifiserte antistoffløsningen diafiltreres med 20 volumer av PBS for å fjerne ureagert DM1, sterilfiltreres og lagres ved 4 °C. Utbytte av antistoff på 40–60 % eller mer oppnås med denne prosessen. Antistofflegemiddelkonjugatet er vanligvis > 95 % monomerisk som vurdert ved gelfiltrering og laserlysspredning. Mengden av bundet legemiddel bestemmes ved differensialabsorpsjonsmålinger ved 252 og 280 nm som beskrevet for fremstillingen av SMCC-DM1-konjugater (beskrevet ovenfor).

Antistofflegemiddelkonjugatene (ADC-er) for anti-CD79b-antistoffer beskrevet heri ved hjelp av MC-MMAF-, MC-MMAE-, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE- eller MC-val-cit (vc)-PAB-MMAF-legemiddelbindingsenheter kan også dannes lik prosedyren beskrevet i US 2005/0238649. Renset anti-CD79b-antistoff oppløses i 500 mM natriumborat og 500 mM natriumklorid ved pH 8,0 og behandles videre med et overskudd av 100 mM ditiotreitol (DTT). Etter inkubering ved 37 °C i ca. 30 minutter utveksles bufferen ved eluering over Sephadex G25-harpiks og elueres med PBS med 1 mM DTPA. Tiol/Ab-verdien kontrolleres ved bestemmelse av den reduserte antistoffkonsentrasjonen fra absorbansen ved 280 nm av løsningen og tiolkonsentrasjonen ved reaksjon med DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) og bestemmelse av absorbansen ved 412 nm. Det reduserte antistoffet som ble oppløst i PBS, ble kjølt på is. Legemiddelbindingsenheten, f.eks. MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE, i DMSO, oppløses i acetonitril og vann og tilsettes til det kjølte reduserte antistoffet i PBS. Etter en times inkubering tilsettes et overskudd av maleimid for å bråkjøle reaksjonen og korke eventuelle ureagerte antistofftiolgrupper. Reaksjonsblandingen konsentreres ved sentrifugal ultrafiltrering, og antistofflegemiddelkonjugatet renses og avsaltes ved eluering

gjennom G25-harpiks i PBS, filtrert gjennom 0,2 µm filtre under sterile forhold, og fryses til lagring.

Antistofflegemiddelkonjugatene (ved hjelp av anti-CD79b-antistoffer beskrevet heri) ble fortynnet ved 2 x 10 µg/ml i analysemedium. Konjugatene ble bundet med kryssbindingsenhetene SMCC (alternativ disulfidbindingsenhet kan anvendes for SPP til maytansinoid DM1-toksin) (se US 2005/0276812 og US 2005/0238649). Konjugatene kan videre bindes med MC-valin-citrullin (vc)-PAB eller MC til dolastatin 10-derivater, monometylauristatin E (MMAE)-toksin eller monometylauristatin F (MMAF)-toksin (se US-søknad nr. 11/141 344, inngitt 31. mai 2005 og US-søknad nr. 10/983 340, inngitt 5. november 2004). Negative kontroller omfattet HERCEPTIN®) (trastuzumab) (anti-HER2)-baserte konjugater (SMCC-DM1 eller SPP-DM1 eller MC-vc-MMAE eller MC-vc-MMAF). Positive kontroller kan omfatte fri L-DM1 tilsvarende konjugatdosen. Prøvene ble blandet på vortekser for å sikre en homogen blanding før fortynning.

Anti-CD79b-antistoffer for legemiddelkonjugering omfattet kimære MA79b-antistoffer (chMA79b) og huMA79b L2/H3-antistoffvariant og huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 og huMA79b.v32 beskrevet heri (se eksempel 1). Ytterligere antistoffer for konjugering kan omfatte hvilke som helst heri beskrevne antistoffer (se eksempel 1).

EKSEMPEL 3: tumorcelledrapsanalyse *in vivo*

A. Xenografter

For å teste virkningen av IgG-varianter av MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter med endringer i HVR-L2 og HVR-H3 (huMA79b L2/H3) ble huMA79b L2/H3-varianten konjugert til DM1, og virkningen av den konjugerte varianten på tumorer hos mus ble analysert.

Antistoffenes evne til å regressere tumorer i multiple xenograftmodeller, herunder RAMOS-celler, BJAB-celler (Burkitts lymfom-cellelinje som inneholder t(2;8)(p112;q24) (IGK-MYC)-translokasjonen, et mutert p53-gen og er Epstein-Barr-virus (EBV)-negativ) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), Granta 519-celler (mantelcellelymfomcellelinje som inneholder t(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH)-

translokasjonen som resulterer i overekspressjonen av syklin D1 (BCL1), inneholder P16INK4B og P16INK4A-delesjoner og er EBV-positiv) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), U698M-celler (lymfoblastisk lymfosarkom B-cellelinje; (Drexler, H.G., 5 The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego. Academic Press, 2001) og DoHH2-celler (follikulært lymfom-cellelinje som inneholder translokasjonen som er karakteristisk for follikulært lymfom t(14;18)(q32;q21) som resulterer i overekspressjonen av Bcl-2 drevet av Igs tunge kjede, inneholder P16INK4A-slettingen, inneholder t(8;14)(q24;q32) (IGH-MYC)-translokasjonen 10 og er EBV-negativ) (Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), kan spesifikt undersøkes.

For analyse av virkningen av MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter ble CB17 ICR SCID-hunnmus (6–8 uker gamle fra Charles Rivers Laboratories; 15 Hollister, CA) inokulert subkutan med 2×10^7 BJAB-luciferaseceller eller Granta-519-celler via injeksjon i flankene på CB17 ICR SCID-mus, og xenografttumorene fikk vokse til et gjennomsnitt på 200 mm^2 . Med dag 0 menes den dagen da tumorene hadde et gjennomsnitt på 200 mm^2 , og da den første eller eneste behandlingsdosen ble gitt, med mindre annet er særlig angitt 20 nedenfor. Tumorvolum ble beregnet på grunnlag av to dimensjoner, målt med krumpassere, og ble uttrykt i mm^3 ifølge formelen: $V = 0,5a \times b^2$, hvor a og b i hvert tilfelle er tumorens lange og korte diametere. Data fra hver forsøksgruppe ble uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ SE. Grupper av 10 mus ble behandlet med en enkelt intravenøs (i.v.) dose på mellom $50 \mu\text{g}$ og $210 \mu\text{g}$ antistoffbundet 25 legemiddel/ m^2 mus (tilsvarende $\sim 1\text{--}4 \text{ mg/kg}$ mus) med MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter eller kontrollantistofflegemiddelkonjugater. Tumorer ble målt enten én gang eller to ganger per uke gjennom hele forsøket. Kroppsvekt for mus ble målt enten én gang eller to ganger per uke gjennom hele forsøket. Musene ble avlivet før tumorvolumene nådde 3000 mm^3 , eller når 30 tumorene viste tegn på forestående ulcerasjon. Alle dyreprotokoller ble godkjent av en Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Bindingsenheter mellom antistoffet og toksinet som ble anvendt, var tioeterkryssbindingsenheten SMCC for DM1. Ytterligere bindingsenheter kan 35 omfatte disulfidbindingsenhet SPP eller tioeterkryssbindingsenhet SMCC for DM1 eller MC eller MC-valin-citrullin(vc)-PAB eller (et valin-citrullin

(vc))dipeptidbindingsreagens) med en maleimidkomponent og en selvimmolativ para-aminobenzylkarbamoylkomponent (PAB) for monometylauristatin E (MMAE) eller monometylauristan F (MMAF). Anvendte toksiner var DM1. Ytterligere toksiner kan omfatte MMAE eller MMAF.

5

CD79b-antistoffer for dette forsøket omfattet kimære MA79b (chMA79b)-antistoffer som beskrevet i US-søknad nr. 11/462 336, inngitt 3. august 2006 og MA79b-podede "humaniserte" antistoffvarianter beskrevet heri (se eksempel 1A). Ytterligere antistoffer kan omfatte kommersielt tilgjengelige antistoffer, herunder anti-CD79b-antistoff, og monoklonale MA79b-antistoffer dannet fra hybridomer deponert hos ATCC som HB11413 20. juli 1993.

10

Negative kontroller omfattet anti-HER2 (HERCEPTIN® (trastuzumab))-baserte konjugater (SMCC-DM1).

15 **B. Resultater**

1. BJAB-luciferasexenografter

I et tidsrom på 35 dager med legemiddelkonjugater og doser som angitt i tabell 9, viste MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant L2/H3 (huMA79b L2/H3-variant) (reformatert som IgG) og kimært anti-CD79b-antistoff (chMA79b) konjugert til DM1 (i hvert tilfelle huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 og chMA79b-SMCC-DM1) inhibering av tumorvekst hos SCID-mus med BJAB-luciferasetumorer sammenlignet med negativ kontroll, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). ADC-er ble tilført i en enkelt dose (som angitt i tabell 9) på dag 0 for alle ADC-er og kontroller. Nærmere bestemt inhiberet huMA79b L2/H3-SMCC-DM1-antistoffene (reformatert som IgG) og chMA79b-SMCC-DM1 tumorvekst i vesentlig grad (figur 20). I tabell 9 er videre angitt antallet mus av det samlede antallet testet mus som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³).

20

25

30

Tabell 9

Tilført antistoff (behandling)	PR	CR	Dose legemiddel - DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	Legemiddel forhold (legemiddel /Ab)
Kontroll-anti-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- DM 1	0/10	0/10	50	1,4	2,4

2. Granta-519-xenografter

I løpet av et tidsrom på 14 dager med legemiddelkonjugater og doser som angitt i tabell 10 viste MA79b-podet "humanisert" antistoffvariant 17, -variant 18, -variant 28 og -variant 32 (i hvert tilfelle huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 og huMA79b.v32) (reformatert som IgG) og kimært anti-CD79b-antistoff (chMA79b) konjugert til DM1 (i hvert tilfelle huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1, huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1 og chMA79b-SMCC-DM1) inhibering av tumorvekst hos SCID-mus med Granta-519-tumorer sammenlignet med negativ kontroll, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). ADC-er ble tilført i en enkelt dose (som angitt i tabell 10) på dag 0 for alle ADC-er og kontroller. Nærmere bestemt inhiberet huMA79b.v28-SMCC-DM1-, huMA79b.v32-SMCC-DM1-, huMA79b.v17-SMCC-DM1- og huMA79b.v18-SMCC-DM1-antistoffene (reformatert som IgG) og chMA79b-SMCC-DM1 tumorvekst i vesentlig grad (figur 21A).

Behandling med huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1 og chMA79b-SMCC-DM1 og kontroll HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1) resulterte videre ikke i en reduksjon i musenes prosentvise kroppsvekt

- (figur 21B). I tabell 10 er enda videre angitt antallet mus av det samlede antallet på ti testede mus som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³).

Tabell 10

Tilført antistoff (behandling)	PR	CR	Dose legemiddel - DM1 (µg/m²)	Dose Ab (mg/kg)	Legemiddel forhold (legemiddel /Ab)
Kontroll-anti-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

- 10 I lys av evnen til MA79b-podete "humaniserte" antistoff-ADC-er til i vesentlig grad å inhibere tumorprogresjon i xenografter kan CD79b-molekyler være utmerkede mål for behandling av tumorer hos pattedyr, herunder B-celleassosiert kreft, slik som lymfomer (dvs. non-Hodgkins-lymfom), leukemier (dvs. kronisk lymfatisk leukemi) og annen kreft i hematopoietiske celler. MA79b-
- 15 podete "humaniserte" ADC-er er videre nyttige for reduksjon av tumorvekst in

vivo av tumorer, herunder B-celleassosiert kreft, slik som lymfomer (dvs. non-Hodgkins-lymfom), leukemier (dvs. kronisk lymfatisk leukemi) og annen kreft i hematopoietiske celler.

EKSEMPEL 4: CD79b-antistoffkolokalisering

5

For å bestemme hvor MA79b-podede "humaniserte" antistoffer og antistoffvarianter tilføres ved internalisering i cellen, kan kolokaliseringsstudier av anti-CD79b-antistoffene internalisert i B-cellelinjer vurderes i Ramos-cellelinjer. LAMP-1 er en markør for sene endosomer og lysosomer (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)), herunder MHC-kompartementer av klasse II (MIIC-er), som er et sent endosom/lysom-lignende kompartement. HLA-DM er en markør for MIIC-er.

- 15 Ramos-celler inkuberes i 3 timer ved 37 °C med 1 µg/ml MA79b-podede "humaniserte" antistoffer og antistoffvarianter, FcR-blokk (Miltenyi) og 25 µg/ml Alexa647-transferrin (molekylsonder) i fullstendig karbonatfritt medium (Gibco) med forekomst av 10 µg/ml leupeptin (Roche) og 5 µM pepstatin (Roche) for å inhibere lysosmal nedbryting. Cellene skylles deretter to ganger, festet med 3 %
- 20 paraformaldehyd (Electron Microscopy Sciences) i 20 minutter ved romtemperatur, bråkjøles med 50 mM NH₄Cl (Sigma), permeabilisert med 0,4 % Saponin / 2 % FBS / 1 % BSA i 20 minutter og inkuberes deretter med 1 µg/ml Cy3 anti-mus (Jackson ImmunoResearch) i 20 minutter. Reaksjonen blokkeres deretter i 20 minutter med IgG fra mus (Molecular Probes), etterfulgt av en 30-
- 25 minutters inkubering med Image-iT FX-signalenhancer (Molecular Probes). Cellene inkuberes til slutt med Zenon Alexa488-merket anti-LAMP1 fra mus (BD Pharmingen), en markør for både lysosomer og MIIC (et lysosomlignende kompartement som er del av MHC-ledningsveien av klasse II), i 20 minutter, og festes etterpå med 3 % PFA. Cellene resuspenderes i 20 µl saponinbuffer og får
- 30 binde til polylysinbelagte (Sigma) diapositiver før montering av et dekkglass med DAPI-inneholdende VectaShield (Vector Laboratories). For immunfluorescens av MIIC eller lysosomer festes, permeabiliseres og forsterkes cellene som ovenfor, deretter farges de samtidig med zenonmerket Alexa555-HLA-DM (BD Pharmingen) og Alexa488-Lamp1 under nærvær av et overskudd av IgG fra mus
- 35 ifølge produsentens anvisninger (Molecular Probes).

Kolokalisering av MA79b-podede "humaniserte" antistoffer eller antistoffvarianter med MIIC eller lysosomer av B-cellelinjer som vurdert ved immunfluorescens kan følgelig angi molekylene som utmerkede stoffer for behandling av tumorer hos pattedyr, herunder B-celleassosiert kreft, slik som lymfomer (dvs. non-Hodgkins-lymfom), leukemier (dvs. kronisk lymfatisk leukemi) og annen kreft i hematopoietiske celler.

EKSEMPEL 5: Fremstilling av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer

10 Fremstilling av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer ble utført som beskrevet heri.

DNA som koder for MA79b-antistoffet (lett kjede, SEQ ID NO: 4, figur 4, og tung kjede, SEQ ID NO: 5, figur 5), ble mutagenisert ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den lette kjeden og den tunge kjeden. DNA som koder for MA79b-antistoffet (tung kjede, SEQ ID NO: 5, figur 5), kan også mutageniseres ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den tunge kjedens Fc-region.

20 DNA som koder for huMA79b.v17-antistoffet (tung kjede, SEQ ID NO: 304, figur 15) ble mutagenisert ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den tunge kjeden. DNA som koder for huMA79b.v17-antistoffet (lett kjede, SEQ ID NO: 303, figur 15, og tung kjede, SEQ ID NO: 304, figur 15), kan også mutageniseres ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den lette kjeden eller den tunge kjedens Fc-region.

DNA som koder for huMA79b.v18-antistoffet (tung kjede, SEQ ID NO: 306, figur 16), ble mutagenisert ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den tunge kjeden. DNA som koder for huMA79b.v18-antistoffet (lett kjede, SEQ ID NO: 305, figur 16, og tung kjede, SEQ ID NO: 306, figur 16), kan også mutageniseres ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den lette kjeden eller den tunge kjedens Fc-region.

DNA som koder for huMA79b.v28-antistoffet (tung kjede, SEQ ID NO: 308, figur 17), ble mutagenisert ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere

den tunge kjeden. DNA som koder for huMA79b.v28-antistoffet (lett kjede, SEQ ID NO: 307, figur 17, og tung kjede, SEQ ID NO: 308, figur 17), kan også mutageniseres ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den lette kjeden eller den tunge kjedens Fc-region.

5

DNA som koder for huMA79b.v32-antistoffet (lett kjede, SEQ ID NO: 310, figur 18, og tung kjede, SEQ ID NO: 309, figur 18) kan mutageniseres ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den lette kjeden og den tunge kjeden.

10

DNA som koder for anti-cyno-CD79b-antistoffet (lett kjede, SEQ ID NO: 241, figur 45 og tung kjede, SEQ ID NO: 243, figur 47), ble mutagenisert ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den lette kjeden og den tunge kjeden. DNA som koder for anti-cyno-CD79b-antistoffet (tung kjede, SEQ ID NO: 243, figur 47), kan også mutageniseres ved fremgangsmåter beskrevet heri for å modifisere den tunge kjedens Fc-region.

15

Ved fremstilling av de cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffene ble DNA som kodet for den lette kjeden, mutagenisert for å substituere cystein med valin i Kabat-posisjon 205 i den lette kjeden (sekvensposisjon 209) som angitt på figur 27 (lett kjede SEQ ID NO: 235 i MA79b tioMAb) og figur 49 (lett kjede SEQ ID NO: 300 i tioMAb anti-cyno-CD79b-(ch10D10)). DNA som koder for den tunge kjeden, ble mutagenisert for å substituere cystein med alanin ved EU-posisjon 118 i den tunge kjeden (sekvensposisjon 118; Kabat-nummer 114) som angitt på figur 48 (tung kjede SEQ ID NO: 244 i tioMAb anti-cyno-CD79b-(ch10D10)-antistoff), figur 28 (tung kjede SEQ ID NO: 236 i MA79b tioMAb), figur 24 (tung kjede SEQ ID NO: 228 i tioMAb huMA79b.v17), figur 25 (tung kjede SEQ ID NO: 230 i tioMAb huMA79b.v18) og på figur 26 (tung kjede SEQ ID NO: 232 i tioMAb huMA79b.v28). Fc-regionen i anti-CD79b-antistoffer kan mutageniseres for å substituere cystein med serin ved EU-posisjon 400 i den tunge kjedens Fc-region (sekvensposisjon 400; Kabat-nummer 396) som angitt i tabell 2-4.

25

30

A. Fremstilling av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer for konjugering ved reduksjon og reoksidering

Cysteinkonstruerte, monoklonale anti-CD79b-antistoffer av full lengde (tioMabs) uttrykt i CHO-celler og renses på en kromatograf med protein A-affinitet etterfulgt av en kromatograf med størrelseseksklusjon. De rensede antistoffene rekonstitueres i 500 mM natriumborat og 500 mM natriumklorid ved ca. pH 8,0 og reduseres med ca. et 50–100 ganger moloverskudd av 1 mM TCEP (tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73–80; Soltec Ventures, Beverly, MA) i ca. 1–2 h ved 37 °C. Det reduserte tioMab fortynnes og lastes på en HiTrap S-kolonne i 10 mM natriumacetat, pH 5 og elueres med PBS inneholdende 0,3 M natriumklorid. Det eluerte, reduserte tioMab behandles med 2 mM dehydroaskorbinsyre (dhAA) ved pH 7 i 3 timer, eller 2 mM vandig kobbersulfat (CuSO₄) ved romtemperatur over natten. Oksidering i omgivelsesluft kan også være effektivt. Bufferen utveksles ved eluering over Sephadex G25-harpiks og elueres med PBS med 1 mM DTPA. Tiol/Ab-verdien anslås ved bestemmelse av den reduserte antistoffkonsentrasjonen fra absorbansen ved 280 nm av løsningen og tiolkonsentrasjonen ved reaksjon med DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) og bestemmelse av absorbansen ved 412 nm.

EKSEMPEL 6: Fremstilling av cysteinkonstruert anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugater ved konjugering av cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffer og mellomprodukter av legemidler/bindingsenheter

Etter reduksjons- og reoksideringsprosedyrene i eksempel 5 rekonstitueres det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistoffet i PBS-buffer (fosfatbufret saltløsning) og kjøles på is. Cirka 1,5 molekvivalenter i forhold til utviklede cysteiner per antistoff av et legemiddelbindingsmellomprodukt av auristatin, slik som MC-MMAE (maleimidokaproyl-monometylauristatin E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE eller MC-val-cit-PAB-MMAF, med en tiolreaktiv funksjonsgruppe slik som maleimido, oppløses i DMSO, fortynnes i acetonitril og vann og tilsettes til det kjølte reduserte og reoksiderte antistoffet i PBS. Etter ca. én time tilsettes et overskudd av maleimid for å bråkjøle reaksjonen og korke eventuelle ureagerede antistofftiolgrupper. Reaksjonsblandingen konsentreres ved sentrifugal ultrafiltrering, og det cysteinkonstruerte anti-CD79b-antistofflegemiddelkonjugatet renses og avsaltes ved eluering gjennom G25-

harpiks i PBS, filtreres gjennom 0,2 µm filtre under sterile forhold, og fryses til lagring.

Fremstilling av huMA79b.v18-HC(A118C) tioMAb-BMPEO-DM1 ble utført på
 5 følgende måte. Det frie cysteinet på huMA79b.v18-HC(A118C) tioMAb ble
 modifisert av bis-maleimido-reagenset BM(PEO)3 (Pierce Chemical), hvilket
 etterlater en ureagert maleimidogruppe på overflaten av antistoffet. Dette ble
 oppnådd ved oppløsning av BM(PEO)3 i en 50 % blanding av etanol/vann til en
 konsentrasjon på 10 mM og tilsetning av et ti ganger moloverskudd av
 10 BM(PEO)3 til en løsning inneholdende huMA79b.v18-HC(A118C) tioMAb i
 fosfatbufret saltløsning ved en konsentrasjon på ca. 1,6 mg/ml (10 mikromolar),
 og som fikk reagere i 1 time. Overskudd av BM(PEO)3 ble fjernet ved
 gelfiltrering (HiTrap-kolonne, Pharmacia) i 30 mM citrat, pH 6 med 150 mM
 NaCl-buffer. Et ca. 10 ganger overskudd av DM1 oppløst i dimetylacetamid
 15 (DMA) ble tilsatt til huMA79b.v18-HC(A118C) tioMAb-BMPEO-mellomproduktet.
 Dimetylformamid (DMF) kan også benyttes til å oppløse legemiddelenhetens
 reagens. Reaksjonsblandingen fikk reagere over natten før gelfiltrering eller
 dialyse til PBS for å fjerne ureagert legemiddel. Gelfiltrering på S200-kolonner i
 PBS ble anvendt til å fjerne aggregater med høy molekylvekt og sikre renset
 20 huMA79b.v18-HC(A118C) tioMAb-BMPEO-DM1.

Ved samme protokoller ble tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1,
 tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, tio-kontroll-hu-anti-HER2-
 HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE og tio-kontroll-anti-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF
 25 generert.

Ved prosedyrene ovenfor ble følgende cysteinkonstruerte anti-CD79b-
 antistofflegemiddelkonjugater (TDC-er) fremstilt og testet:

1. tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF ved konjugering av A118C-tio-
 30 huMA79b.v18-HC(A118C) og MC-MMAF,
2. tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 ved konjugering av A118C-tio-
 huMA79b.v18-HC(A118C) og BMPEO-DM1,
3. tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ved konjugering av A118C-
 tio-huMA79b.v18-HC(A118C) og MC-val-cit-PAB-MMAE,

4. tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF ved konjugering av A118C-tio-huMA79b.v28-HC(A118C) og MC-MMAF,
5. tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 ved konjugering av tio-huMA79b.v28-HC(A118C) og BMPEO-DM1,
- 5 6. tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-val-cit-PAB-MMAE ved konjugering av tio-huMA79b.v28-HC(A118C) og MC-val-cit-PAB-MMAE,
7. tio-anti-cynoCD79b-(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF ved konjugering av A118C-tio-anti-cynoCD79b-(ch10D10)-HC(A118C) og MC-MMAF,
- 10 8. tio-anti-cynoCD79b-(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 ved konjugering av A118C-tio-anti-cynoCD79b-(ch10D10)-HC(A118C) og BMPEO-DM1,
9. tio-anti-cynoCD79b-(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ved konjugering av A118C-tio-anti-cynoCD79b-(ch10D10)-HC(A118C) og MC-val-cit-PAB-MMAE,
- 15 10. tio-MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF ved konjugering av tio-MA79b-HC(A118C) og MC-MMAF, og
11. tio-MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF ved konjugering av tio-MA79b-LC(V205C) og MC-MMAF.

EKSEMPEL 7: Karakterisering av cysteinkonstruerte tioMAb-legemiddelkonjugaters bindingsaffinitet for celloverflateantigen

Tio-huMA79b.v18-, tio-huMA79b.v28-legemiddelkonjugatenes og tio-MA79b-legemiddelkonjugatenes bindingsaffinitet for CD79b uttrykt på BJAB-luciferaseceller ble bestemt ved FACS-analyse. Tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-legemiddelkonjugatenes bindingsaffinitet for CD79b uttrykt på BJAB-celler som uttrykker cynoCD79b, ble videre bestemt ved FACS-analyse.

Ca. 1×10^6 celler i 100 μ l ble kort fortalt omsatt med skiftende mengder (1,0 μ g, 0,1 μ g eller 0,01 μ g Ab per million celler av BJAB-luciferaseceller eller BJAB-

- celler som uttrykker cynoCD79b (for anti-cynoCD79b tioMAbs)) for én av følgende anti-CD79b-tioMAb-legemiddelkonjugater eller nakne (ukonjugert Ab som en kontroll): 1) tio-MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF eller 2) tio-MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF (i hvert tilfelle figur 29A–B), 3) tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, 4) tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE eller 5) tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (i hvert tilfelle figur 30B–D), 6) tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 7) tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, eller 8) tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (se i hvert tilfelle figur 31B–31D), eller 9) tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 10) tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 eller 11) tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF (se i hvert tilfelle figur 32B–32D). PE-konjugert anti-humant Ig fra mus ble anvendt som sekundært påvisende antistoff (BD Cat#555787).
- 15 Anti-CD79b-antistoff bundet til celleoverflaten ble påvist ved hjelp av PE-konjugert anti-humant Ig fra mus. Grafene på figur 29–32 angir at antigenbindingen var omtrent lik for alle de testede tioMAb-legemiddelkonjugatene.

EKSEMPEL 8: Analyse for reduksjon av celleproliferasjon in vitro ved anti-CD79b-tioMab-legemiddelkonjugater

- Potensen *in vitro* av anti-CD79b-tioMAb-legemiddelkonjugater (omfattende tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MCMMAF, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE og tio-huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1) ble målt ved en celleproliferasjonsanalyse (figur 41A, BJAB-luciferase, figur 41B, Granta-519, figur 41C, WSU-DLCL2). CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay er en kommersielt tilgjengelig (Promega Corp., Madison, WI), homogen analysemetode basert på den rekombinante ekspresjonen av *Coleoptera*-luciferase (US 5583024; US 5674713; US 5700670). Denne
- 25 celleproliferasjonsanalysen bestemmer antallet levedyktige celler i kultur basert på kvantitering av tilstedeværende ATP, en indikator på metabolsk aktive celler (Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160: 81–88 (1993); US 6602677). CellTiter-Glo®-analysen ble utført i 96-brønnersformat, hvilket gjorde den mottagelig for automatisk screening med høy gjennomstrømningshastighet (HTS) (Cree et al.,
- 30 AntiCancer Drugs, 6:398–404 (1995)). Den homogene analyseprosedyren

omfatter tilsetning av det enkelte reagenset (CellTiter-Glo®-reagenset) direkte til celler dyrket i serumsupplert medium.

5 Det homogene formatet "tilsett-bland-mål" resulterer i cellelyse og generering av et luminescerende signal som er proporsjonalt med mengden av tilstedeværende ATP. Substratet, Beetle Luciferin, dekarboksyleres oksidativt ved rekombinant luciferase fra ildflue med samtidig omdannelse av ATP til AMP og generering av fotoner. Levedyktige celler gjenspeiles i relative luminescensenheter (RLU). Data kan registreres med luminometer eller CCD-kameraopptaker.

10 Luminescenssignalet presenteres som RLU, målt over tid. RLU i % er normalisert RLU-prosent sammenlignet med en "ikke-legemiddelkonjugat"-kontroll. Fotoner fra luminescens kan eventuelt telles i en scintillasjonsteller under nærvær av et scintillasjonsmiddel. Lysenheterne kan da representeres som CPS (antall per sekund).

15

Virkningen av tioMAB-legemiddelkonjugater ble målt ved en celleproliferasjonsanalyse ved hjelp av følgende protokoll, tilpasset etter CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485–5488 (2002)):

20 1. En alikvot på 40 µl cellekultur inneholdende ca. 3000 BJAB-, Granta-519- eller WSU-DLCL2-celler i medium ble plassert i hver brønn på en 384-brønners, skråvegget plate.

2. TDC (tioMab Drug Conjugate) (10 µl) ble tilsatt til firedoble forsøksbrønner til en sluttkonsentrasjon på 10 000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13,7, 4,6 eller 1,5 ng/ml, med "ikke-legemiddelkonjugat"-kontrollbrønner som tar imot bare medium, og inkubert i 3 dager.

25

3. Platene ble ekvilibrert til romtemperatur i ca. 30 minutter.

4. CellTiter-Glo-reagens (50 µl) ble tilsatt.

5. Innholdet ble blandet i 2 minutter på en orbitalrister for å indusere cellelyse.

30

6. Platen ble inkubert ved romtemperatur i 10 minutter for å stabilisere luminescenssignalet.

7. Luminescens ble registrert og rapportert i grafer som RLU i % (relative luminescensenheter).

Data fra celler inkubert med legemiddelkonjugatfritt medium ble vist ved 0,51 ng/ml.

- 5 Medium: BJAB-, Granta-519- og WSU-DLCL2-celler vokser i RPM11640/10%FBS/2 mM glutamin.

EKSEMPEL 9: Analyse for inhibering av tumorvekst in vivo ved anti-CD79b-tioMab-legemiddelkonjugater

A. Granta-519 (humant mantelcellelymfom)

10

I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av tioMab-legemiddelkonjugatene i Granta-519-xenografter (humant mantelcellelymfom) hos CB17 SCID-mus studert.

- 15 Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for all ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 11 nedenfor.

Kontrollen Ab var hu-anti-HER2-MC-MMAF eller MA79b-MC-MMAF. Kontrollen HC(A118C) tioMab var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MMAF tioMab. Resultatene

- 20 er angitt i tabell 11 og på figur 33.

Figur 33A er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorvolum over tid i Granta-519-xenograftet hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C eller den lette kjedens V205C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 11. Tilførsel av tio-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF viste nærmere bestemt inhibering av tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollene (anti-hu-HER2-MC-MMAF og tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF. Andre kontroller omfattet MA79b-MC-MMAF.

- 25
- 30 I samme studie ble endring i prosentvis kroppsvekt i løpet av de 14 første dagene videre bestemt i hver dosegruppe. Resultatene (figur 33B) tydet på at tilførsel av disse tioMab-legemiddelkonjugatene ikke resulterte i en vesentlig reduksjon i prosentvis kroppsvekt eller vekttap i løpet av denne tiden.

- I tabell 11 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

Tabell 11

Tumorvolumreduksjon in vivo, tilførsel av tio-chMA79b-HC(A118C)- eller tio chMA79b-LC(V205C) MMAF-konjugat					
i Granta-519-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF (µg/m ²)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel/Ab)
Kontroll-hu-anti-HER2-MC-MMAF	0/8	0/8	413	6,8	4,0
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	191	6,8	1,85
Kontroll-chMA79b-MC-MMAF	1/8	0/8	100	2,3	3,0
Kontroll-chMA79b-MC-MMAF	8/9	1/9	300	6,8	3,0
Tio-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	63	2,3	1,9
Tio-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	4/9	0/9	190	6,8	1,9
Tio-chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	0/8	0/8	60	2,3	1,8
Tio-chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	5/9	4/9	180	6,8	1,8

I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av ytterligere legemiddelkonjugater testet i BJAB-luciferasexenografter (Burkitts lymfom) hos CB17 SCID-mus. Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for all ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 12 nedenfor.

Kontrollantistoffet var huMA79b.v28 (konjugert til SMCC-DM1). Kontrollen HC(A118C) tioMAb var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-antistoffet tioMAb (konjugert til BMPEO-DM1, MC-MMAF eller MCvcPAB-MMAE), tio-huMA79b.v28-HC(A118C) tioMAb eller tio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C) tioMAb (konjugert til MC-MMAF). Resultatene er angitt i tabell 12 og på figur 34 nedenfor.

Figur 34A er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorvolum over tid i BJAB-luciferasexenograftene hos CB17 SCID-mus behandlet med huMA79b.v28-HC(A118C) tioMAb-legemiddelkonjugatene som angitt i tabell 12. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE tioMAb-legemiddelkonjugatet viste nærmere bestemt en inhibering i tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollantistofflegemiddelkonjugatene (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). Andre kontroller var tio-huMA79b.v28-HC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 og tio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF.

I samme studie ble endring i prosentvis kroppsvekt i løpet av de 7 første dagene videre bestemt i hver dosegruppe. Resultatene (figur 34B) tydet på at tilførsel av disse tioMAb-legemiddelkonjugatene ikke resulterte i en vesentlig reduksjon i prosentvis kroppsvekt eller vekttap i løpet av denne tiden.

I tabell 12 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

Tabell 12

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE-, MMAF- og DM1-konjugat					
i BJAB-luciferasexenografter hos CB 17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (lege- middel/ Ab)
Tio-kontroll-hu-anti- HER2-HC(A118C)-BMPEO- DM1	0/10	0/10	57	2	1,86
Tio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	58	2	1,9
Tio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/10	0/10	46	2	1,55
Kontroll-huMA79b.v28- SMCC-DM1	2/10	3/10	101	2	3,4
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	2/10	55	2	1,85
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	10/1 0	57	2	1,95
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/10	10/1 0	54	2	1,87
Tio-kontroll-huMA79b.v28- HC(A118C)	0/10	0/10	–	2	–
Tio-kontroll-hu-anti- CD22(10F4v3)- HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	4/10	59	2	1,96

C. WSU-DLCL2-xenografts (diffust storcellet lymfom)

I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av tioMAb-legemiddelkonjugater i WSU-DLCL2-xenografts (diffust storcellet lymfom) ved follikulært lymfom hos CB17 SCID-mus studert. Legemiddelkonjugatene og dosene er angitt i tabell 13 nedenfor.

Kontrollantistoffet var huMA79b.v28 (konjugert til SMCC-DM1). Kontrollen HC(A118C) tioMAb var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-antistoffet tioMAb (konjugert til BMPEO-DM1, MC-MMAF eller MCvcPAB-MMAE), tio-huMA79b.v28-HC(A118C) tioMAb eller tio-anti-CD22 10F4v3-HC(A118C) tioMAb (konjugert til MC-MMAF). Resultatene er angitt i tabell 13 nedenfor.

Figur 35A er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorvolum over time i WSU-DLCL2-xenograftet (diffust storcellet lymfom) hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 13. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-huMA79b.v28-HC(A118c)-MCvcPAB-MMAE viste nærmere bestemt inhibering av tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollene (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)). Andre kontroller omfattet tio-huMA79b.v28-HC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 og tio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF.

Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC lot til å være den mest virkningsfulle av teststoffene i denne studien.

I samme studie ble endring i prosentvis kroppsvekt i løpet av de 7 første dagene videre bestemt i hver dosegruppe. Resultatene (figur 35B) tydet på at tilførsel av disse tioMAb-legemiddelkonjugatene ikke resulterte i en vesentlig reduksjon i prosentvis kroppsvekt eller vekttap i løpet av denne tiden.

I tabell 13 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst

tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

5

Tabell 13

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE-, MMAF- og DM1-konjugat					
i WSU-DLCL2-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 (µg/m ²)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel/Ab)
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	115	4	1,9
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	92	4	1,55
Kontroll-huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/10	0/10	202	4	3,4
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	110	4	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/10	1/10	115	4	1,95
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	3/10	108	4	1,87
Tio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	–	4	–
Tio-kontroll-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	118	4	1,96
Tio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	–	4	–

D. DOHH2-xenografter (follikulært lymfom)

I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble tioMAb-legemiddelkonjugatenes evne til å redusere B-celletumorstørrelse i DOHH2 xenograftmodeller hos CB17 SCID-mus studert. Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for alle ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 14 nedenfor.

Kontrollen Ab var huMA79b.v28 (konjugert til SMCC-DM1). Kontrollen HC(A118C)-tioMAb var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C) tioMAb (konjugert til BMPEO-DM1, MC-MMAF eller MCvcPAB-MMAE), tio-huMA79b.v28-HC(A118C) tioMAb og tio-hu-anti-CD22-HC(A118C) (konjugert til MC-MMAF). Resultatene er angitt i tabell 14 og på figur 36.

15

Figur 36A er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorstørrelse over tid i DOHH2-cellexenograftet hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C ADC-er ved doser som angitt i tabell 14. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE tioMAb-legemiddelkonjugatene ved dosene angitt i tabell 14 viste nærmere bestemt en inhibering i tumorstørrelse sammenlignet med de negative kontrolllegemiddelkonjugater (tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE. Andre kontroller omfattet tio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C), tio-kontroll-anti-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C) og kontroll-huMA79b.v28-SMCC-DM1.

25

I tabell 14 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorstørrelsen på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorstørrelsen målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorstørrelsen på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

35

Tabell 14

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1-, MMAF- og MMAE-konjugat					
i DOHH2-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF eller DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel /Ab)
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1,86
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1,55
Kontroll-huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/8	1/8	202	4	3,4
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/9	1/9	110	4	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	4/9	115	4	1,95
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	9/9	108	4	1,87
Tio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	1/9	0/9	–	4	–
Tio-kontroll-anti-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	118	4	1,96

E. BJAB-luciferasexenografter (Burkitts lymfom)

- 5 I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3, idet de tilførte antistofflegemiddelkonjugatene og dosene ble

endret, ble virkningen av legemiddelkonjugater i BJAB-luciferasexenografter (Burkitts lymfom) hos CB17 SCID-mus studert. Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for alle ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 15 nedenfor.

5

Kontrollantistoffet var vehikkel (bare buffer (for ADC)). Kontrollen HC(A118C) tioMAb var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-antistoffet tioMAb (konjugert til BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE eller MC-MMAF), tio-huMA79b.v28-HC(A118C) tioMAb eller tio-anti-CD22 10F4v3-HC(A118C) tioMAb (konjugert til MC-MMAF). Resultatene er angitt i tabell 15 nedenfor.

10

Figur 37A er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorvolum over tid i BJAB-luciferasexenograftet hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 15. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF viste nærmere bestemt inhibering av tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollene (tio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, tio-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). Andre kontroller omfattet tio-huMA79b.v28-HC(A118C) og tio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF.

15

20

I tabell 15 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

25

Tabell 15

30

Tumorvolumreduksjon in vivo,	
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE-, MMAF-, og DM1-konjugat	
i BJAB-luciferasexenografter hos CB17 SCID-mus	

Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel/Ab)
Kontrollvehikkel	0/10	0/10	–	–	–
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	57	2	1,86
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	23	1	1,55
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	29	1	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	2/10	0/10	27	1	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/10	0/10	55	2	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	1/10	27	1	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/8	1/8	28	1	1,9
Tio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	–	1	–
Tio-kontroll-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	1/10	30	1	1,96

F. Granta-519-xenograft (humant mantelcellelymfom)

- 5 I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av tioMAB-legemiddelkonjugater i Granta-519-xenograft (humant mantelcellelymfom hos CB17 SCID-mus studert. Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for all ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 16 nedenfor.

Kontrollen HC(A118C) tioMAb var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C) tioMAb (konjugert til BMPEO-DM1 eller MC-MMAF). Resultatene er angitt i tabell 16 og på figur 38.

5

Figur 38A er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorvolum over tid i Granta 519-xenograftet hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 16. Tilførselen av tio-huMA79b.v28-HC-(A118C)-BMPEO-DM1 og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF tioMAb-legemiddelkonjugatene ved dosene angitt i tabell 16 viste nærmere bestemt en inhibering i tumorvekst sammenlignet med kontrollegemiddelkonjugatene.

I samme studie ble endring i prosentvis kroppsvekt i løpet av de 14 første dagene videre bestemt i hver dosegruppe. Resultatene (figur 38B) tydet på at tilførsel av disse tioMAb-legemiddelkonjugatene ikke resulterte i en reduksjon i prosentvis kroppsvekt eller forårsaket vekttap i løpet av denne tiden.

I tabell 16 er angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³). (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

25

Tabell 16

Tumorvolumreduksjon in vivo,						
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1- og MMAF-konjugat						
i Granta-519-xenografter hos CB17 SCID-mus						
Tilført antistoff	PR	CR	Dose eller MMAF DM1 (µg/m ²)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel/Ab)	
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/R	342	12	1,86	

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1- og MMAF-konjugat					
i Granta-519-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose eller MMAF DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel/Ab)
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	346	12	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/6	0/6	55	2	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	110	4	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/8	4/8	219	8	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	5/8	329	12	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	1/8	1/8	57	2	1,95
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	2/8	1/8	115	4	1,95
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	6/8	2/8	229	8	1,95
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	4/8	4/8	344	12	1,95

G. WSU-DLCL2-xenografter (diffust storcellet lymfom)

- I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av tioMAb-legemiddelkonjugatene i WSU-DLCL2-

xenografter (diffust storcellet lymfom) hos CB17 SCID-mus studert. Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for all ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 17 nedenfor.

- 5 Kontrollantistoffet var vehikkel (bare buffer (for ADC)). Kontrollen tio-MAbs var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-antistoffet tioMAbs (konjugert til BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE eller MC-MMAF). Resultatene er angitt i tabell 17 og på figur 39.

Figur 39 er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorvolum over tid i
 10 WSU-DLCL2-xenograftet hos CB17 SCID mus behandlet med den tunge kjedens A118C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 17. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (ved Ab-dose på 0,5, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg og 4,0 mg/kg) viste nærmere bestemt inhibering av
 15 tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollene (tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF og A-vehikkel).

I tabell 17 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet
 20 som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

25 Tabell 17

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE-, MMAF- og DM1-konjugat					
i WSU-DLCL2-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 (µg/m ²)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel/Ab)
Kontrollvehikkel	0/9	0/9	–	–	–
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1,86

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE-, MMAF- og DM1-konjugat					
i WSU-DLCL2-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel/Ab)
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1,55
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	2/9	112	4	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/9	0/9	110	4	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	0/9	14	0,5	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	27	1,0	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	1/9	55	2,0	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	7/9	110	4,0	1,9

H. Granta-519-xenografter (humant mantelcellelymfom)

I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av tioMAb-legemiddelkonjugatene i Granta-519-xenografter (humant mantelcellelymfom) hos CB17 SCID-mus studert.

5 Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for alle ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 18 nedenfor.

Kontrollen tio-MAbs var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C) (konjugert til BMPEO-DM1) og tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-antistoffet tioMAbs.

10 Resultatene er angitt i tabell 18 nedenfor.

Figur 40A er en graf som viser endringer i gjennomsnittlig tumorvolum over tid i Granta-519-xenograftet hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 18. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (ved Ab-dose på 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg og 4,0 mg/kg) viste nærmere bestemt inhibering av tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollene (tio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1 og tio-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE).

15

20

I tabell 18 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

25

Tabell 18

Tumorvolumreduksjon in vivo,
tilførsel av tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1- og MMAE-konjugat
i Granta-519-xenografter hos CB17 SCID-mus

Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (lege- middel/ Ab)
Tio-kontroll-hu-anti- HER2-HC(A118C)-BMPEO- DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Tio-kontroll-hu-anti- HER2-HC(A118C)- MCvcPAB-MMAE	2/10	1/10	92	4	1,55
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	0/10	110	4	1,85
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/10	1/10	13	0,5	1,87
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	1/10	0/10	27	1,0	1,87
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	1/10	7/10	54	2,0	1,87
Tio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/10	10/10	108	4,0	1,87

I. BJAB-cynoCD79b-xenografter

- 5 I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av tioMAb-legemiddelkonjugatene i BJAB-celler (Burkitts lymfom) som uttrykte cynoCD79b-xenografter(BJAB-cynoCD79b) hos CB17

SCID-mus studert. Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for alle ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 18 nedenfor.

Kontrollen Ab var vehikkel (bare buffer). Kontrollen tio-MAbs var tio-hu-anti-
 5 HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-antistoffet tioMAbs. Resultatene er angitt i tabell 19 og på figur 50.

Figur 50 er en graf som viser inhibering av tumorvekst over tid i BJAB-
 10 cynoCD79b-xenograftet hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 19. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE og tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF og tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-
 15 HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE og tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF viste nærmere bestemt inhibering av tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollene (tio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE og tio-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF og A-vehikkel).

20

I tabell 19 er enda videre angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt
 25 etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

Tabell 19

Tumorvolumreduksjon in vivo,
tilførsel av tio-anti-cyno-CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1-, MMAF- eller MMAE- eller tio-HuMA79b.v28 DM1-, MMAF- eller MMAE-konjugat
i BJAB-cynoCD79b-xenografter hos CB17 SCID-mus

Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (lege- middel/ Ab)
Kontrollvehikkel	0/9	0/9	–	–	–
Tio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	57	2	1,86
Tio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	23	1	1,55
Tio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	29	1	1,9
Tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)- HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	1/8	53	2	1,8
Tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)- HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	2/9	27	1	1,86
Tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)- HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	1/9	28	1	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)- BMPEO-DM1	3/9	0/9	55	2	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)- MCvcPAB-MMAE	2/9	2/9	27	1	1,9
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)- MC-MMAF	7/9	1/9	28	1	1,9

J. BJAB-cynoCD79b-xenografter

- I en lignende studie med samme xenograftstudieprotokoll som beskrevet i eksempel 3 (se ovenfor), idet de tilførte legemiddelkonjugatene og dosene ble endret, ble virkningen av tioMAb-legemiddelkonjugater i BJAB (Burkitts lymfom) som uttrykte cynoCD79b-xenograft (BJAB cynoCD79b) hos CB17 SCID-mus studert. Legemiddelkonjugatene og dosene (tilført på dag 0 for all ADC-er og kontroller) er angitt i tabell 19 nedenfor.

Kontrollen tio-MAbs var tio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio-huMA79b.v28-HC(A118C) og tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-antistoffet tioMAbs. Resultatene er angitt i tabell 20 og på figur 51.

5

Figur 51 er en graf som viste inhibering av tumorvekst over tid i BJAB-cynoCD79b-xenograftet hos CB17 SCID-mus behandlet med den tunge kjedens A118C anti-CD79b TDC-er ved doser som angitt i tabell 20. Tilførsel av tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 og tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 viste nærmere bestemt inhibering av tumorvekst sammenlignet med de negative kontrollene (tio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1. Andre kontroller omfattet tio-hu-MA79b.v28-HC(A118C) og tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C).

10

15 Resultatene er angitt i tabell 20 nedenfor. I Tabell 20 er angitt antallet mus av det samlede testede antallet som viste PR = delvis regresjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt under 50 % av tumorvolumet målt på dag 0) eller CR = fullstendig remisjon (hvor tumorvolumet på et hvilket som helst tidspunkt etter tilførsel falt til 0 mm³) og – = ikke relevant. (DAR = legemiddel/antistoff-forhold)

20

Tabell 20

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-anti-cyno-CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1- eller tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1-konjugat					
i BJAB-cynoCD79b-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 (µg/m ²)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel /Ab)
Tio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1,86
Tio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	–	2	–

Tumorvolumreduksjon in vivo,					
tilførsel av tio-anti-cyno-CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1- eller tio-HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1-konjugat					
i BJAB-cynoCD79b-xenografter hos CB17 SCID-mus					
Tilført antistoff	PR	CR	Dose MMAF, MMAE eller DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dose Ab (mg/kg)	DAR (legemiddel /Ab)
Tio-kontroll-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)	0/10	0/10	–	2	–
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/10	0/10	27	1	1,85
Tio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	2/10	55	2	1,85
Tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	27	1	1,8
Tio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	53	2	1,8

- Den foregående skriftlige patentteksten er ansett for å være tilstrekkelig til å gjøre det mulig for fagmannen å utøve oppfinnelsen. Den foreliggende oppfinnelsen skal ikke være begrenset i omfang av den avgitte tankekonstruksjonen, siden den avgitte utførelsesformen er ment som én enkelt illustrasjon av visse aspekter ved oppfinnelsen. Avgivelsen av materiale heri utgjør ingen innrømmelse av at den skriftlige beskrivelsen heri er uskikket til å muliggjøre utøvelse av noe aspekt ved oppfinnelsen, inkludert beste modus derav, og skal heller ikke tolkes som å begrense kravenes omfang til de spesifikke illustrasjonene den representerer. Ulike modifiseringer av oppfinnelsen i tillegg til de som vises og beskrives heri, vil således være åpenbare for fagmannen ut fra den foregående beskrivelsen.

P a t e n t k r a v

1. Humanisert anti-CD79b-antistoff omfattende:

(1) den tunge kjedens variable domene med SEQ ID NO:208 og den lette
5 kjedens variable domene med SEQ ID NO:207; eller

(2) en tung kjedes variable domene som har minst 90 %
aminosyresekvensidentitet til aminosyresekvensen av SEQ ID NO:208, og en lett
kjedes variable domene som har minst 90 % aminosyresekvensidentitet til
aminosyresekvensen av SEQ ID NO:207, hvor antistoffets affinitet, i sin
10 bivalente form, til humant CD79b er i det vesentlige den samme som eller minst
2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 ganger større enn affiniteten til et murint eller
kimerisk antistoff omfattende en lett kjedes og en tung kjedes variable sekvens
av SEQ ID NO: 10 og SEQ ID NO: 14 i sin bivalente form, hvor
bindingsaffiniteten uttrykkes som en K_d-verdi, og hvor bindingsaffiniteten måles
15 ved Biacore.

2. Humanisert anti-CD79b-antistoff omfattende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-
H1, HVR-H2 og HVR-H3:

hvor HVR-L1 omfatter en HVR-L1-variant der posisjon A9 i sekvens A1-A15 er
blitt modifisert til E, hvor A1-A15 er KASQSVDYDGDSFLN;

20 hvor HVR-H3 omfatter en HVR-H3-variant der posisjon F6 i sekvens F1-F10 er
blitt modifisert til I, posisjon F7 er blitt modifisert til R og posisjon F8 er blitt
modifisert til L, hvor F1-F10 er TRRVVPVYFDY;

og hvor tre eller fire av HVR-L2, HVR-L3, HVRH1 og HVR-H2 er valgt fra gruppen
bestående av:

25 (i) HVR-L2 omfattende sekvens B1-B7, hvor B1-B7 er AASNLES;

(ii) HVR-L3 omfattende sekvens C1-C9, hvor C1-C9 er QQSNEPLT;

(iii) HVR-H1 omfattende sekvens D1-D10, hvor D1-D10 er GYTFSSYWIE;
og

(iv) HVR-H2 omfattende sekvens E1-E18, hvor E1-E18 er GEILPGGGDTNYNEIFKG

hvor antistoffets affinitet, i sin bivalente form, til humant CD79b er i det vesentlige den samme som eller minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 ganger større enn affiniteten til et murint eller kimerisk antistoff omfattende en lett kjedes og tung kjedes variable sekvens av SEQ ID NO: 10 og SEQ ID NO: 14 i sin bivalente form, hvor bindingsaffiniteten uttrykkes som en Kd-verdi, og hvor bindingsaffiniteten måles ved Biacore.

10 3. Antistoffet ifølge krav 1 eller krav 2, hvilket binder samme epitop som et monoklonalt antistoff omfattende de variable domenene med SEQ ID No:10 og SEQ ID No:14.

15 4. Antistoffet ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvilket binder til en epitop i en region av CD79b fra aminosyre 29-39 i SEQ ID NO: 2 eller aminosyre 1-11 i SEQ ID NO: 16.

20 5. Antistoffet ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvilket er (i) et monoklonalt antistoff, eller (ii) et antistoffragment valgt fra et Fab-, Fab'-SH-, Fv-, scFv- eller (Fab')₂-fragment, eventuelt et monovalent eller bivalent antistoff, eventuelt omfattende en enkelt Fab-region bundet til en Fc-region.

25 6. Det humaniserte antistoffet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene omfattende human kappa-undergruppe 1-konsensusrammeverksekvens i den lette kjede og/eller human undergruppe III-konsensusrammeverksekvens i den tunge kjede.

7. Det humaniserte antistoffet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, omfattende:

30 i) en lett kjedes humane kappa-undergruppe 1-konsensusrammeverksekvens med en substitusjon ved posisjon 4 og/eller posisjon 47, eventuelt M4L og/eller L47F; og/eller

ii) en tung kjedes humane undergruppe III-konsensusstruktursekvens med en substitusjon ved posisjon 48, 67, 69, 71, 73 og/eller 78, eventuelt V48I, F67A, I69F, R71A, N73T og/eller L78A.

8. Fremgangsmåte for å fremstille et antistoff ifølge et hvilket som helst
5 foregående krav, omfattende dyrking av vertsceller under betingelser som egner seg til ekspresjon av antistoffet og utvinning av antistoffet fra cellekulturen.

9. Immunkonjugat omfattende antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, kovalent bundet til

10 i) et cytotoxisk stoff, eventuelt et kjemoterapeutisk stoff, en legemiddelenhet, et antibiotikum, en radioaktiv isotop og et nukleolytisk enzym;

ii) en innfangingsmarkør, eventuelt en biotininnfangingsmarkør;

15 iii) en påvisningsmarkør, eventuelt en påvisningsmarkør med fluorescerende fargestoff slik som fluoresceintype, en rhodamintype, dansyl, Lissamine, et cyanin, et fykoerytrin, texasrød og en analog derav, eller en radionuklidpåvisningsmarkør valgt fra ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At , og ^{213}Bi , hvor antistoffet eventuelt er bundet til påvisningsmarkøren av en
20 chelaterende ligand, eventuelt DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA eller TETA.

10. Immunkonjugatet ifølge krav 9, hvor immunkonjugatet har formelen Ab-(L-D)p, hvor:

(a) Ab er antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7,

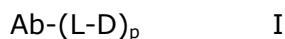
25 (b) L er en bindingsenhet, og

(c) D er en legemiddelenhet,

hvor eventuelt L er 6-maleimidokaproyl (MC), maleimidopropanoyl (MP), valin-citrullin (val-cit), alanin-fenylalanin (ala-phe), p-aminobenzylsyloksykarbonyl (PAB), N-sukkinimidyl-4-(2-pyridyltio)pentanoat (SPP), N-sukkinimidyl-4-(N-

maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (SMCC) eller N-sukkinimidyl-(4-jod-acetyl)aminobenzoat (SIAB), og/eller D er et auristatin eller dolostatin.

11. Immunkonjugatet ifølge krav 9, omfattende en auristatin- eller
5 maytansinoidlegemiddelenhet (D), hvor antistoffet er bundet av en
bindingsenhet (L) til D, idet forbindelsen har formel I:



10 hvor p er 1 til 8; hvor eventuelt

(i) L har formelen:



hvor:

A er en stretcherenhet,

15 a er 0 eller 1,

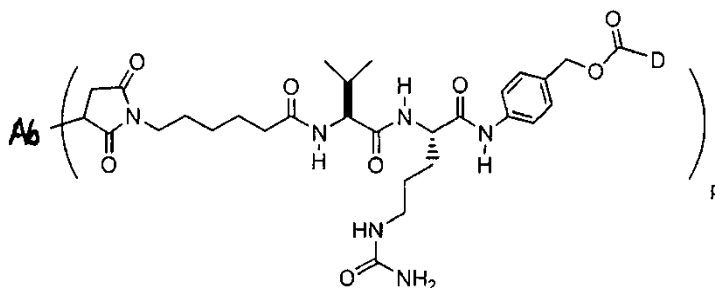
W i hvert tilfelle uavhengig er en aminosyreenhet,

w er et heltall fra 0 til 12,

Y er en spacerenhet kovalent bundet til legemiddelenheten, og

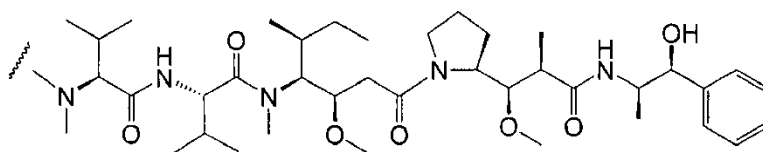
y er 0, 1 eller 2

20 (ii) immunkonjugatforbindelsen har formelen:



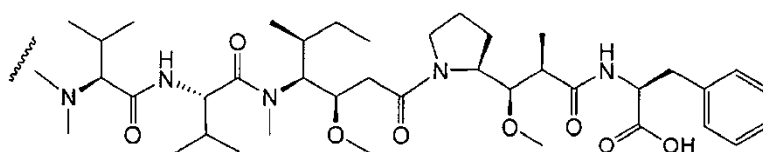
(iii) L er SMCC, SPP eller SPDB;

(iv) D er MMAE, som har strukturen:



hvor bølgelinjen angir bindingsstedet til bindingsenheten L;

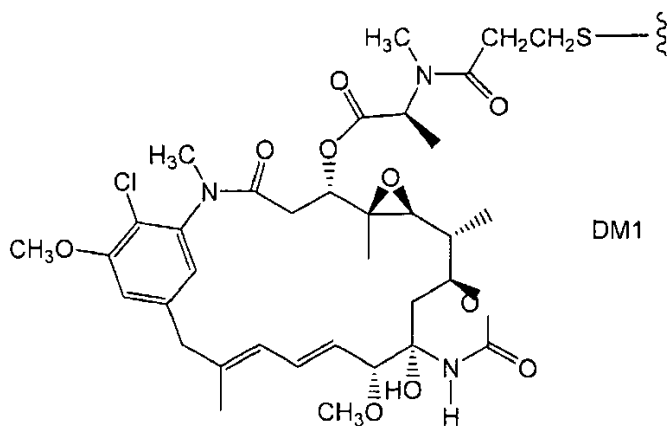
(v) D er MMAF, som har strukturen:



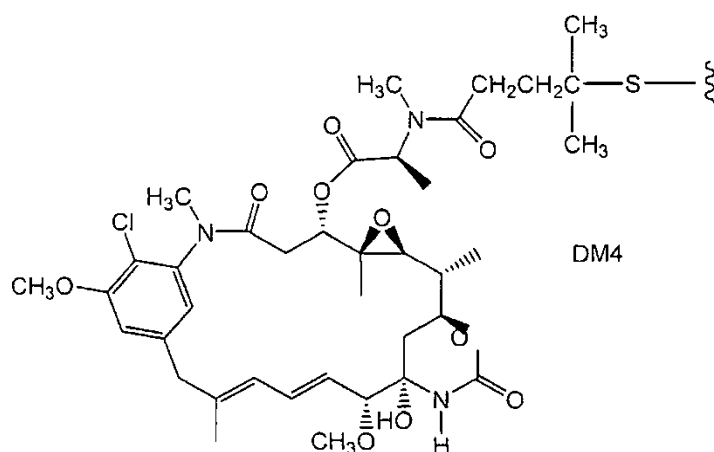
5

hvor bølgelinjen angir bindingsstedet til bindingsenheten L;

(vi) D er DM1 eller DM4, som har strukturene:

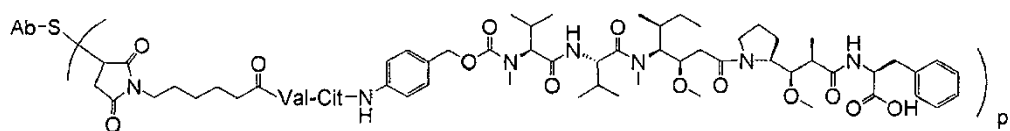


380



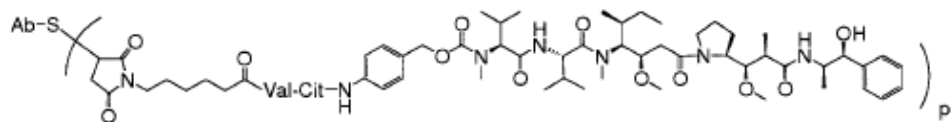
hvor bølgelinjen angir bindingsstedet til bindingsenheten L;

(vii) immunkonjugatforbindelsen valgt fra strukturene:

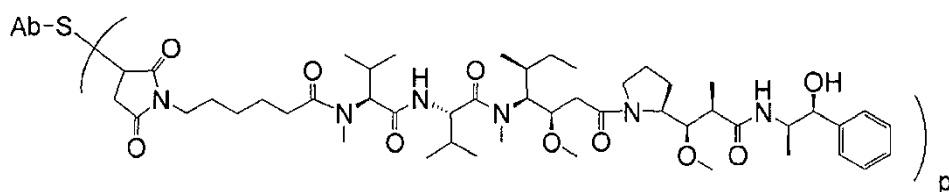


Ab-MC-vc-PAB-MMAF

5

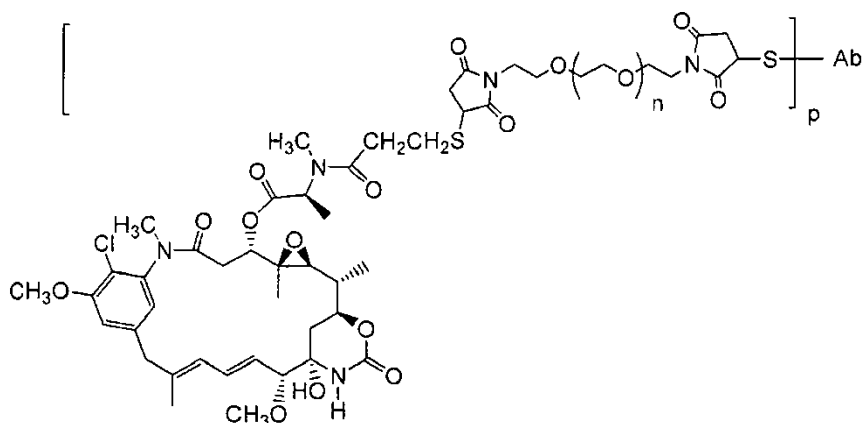
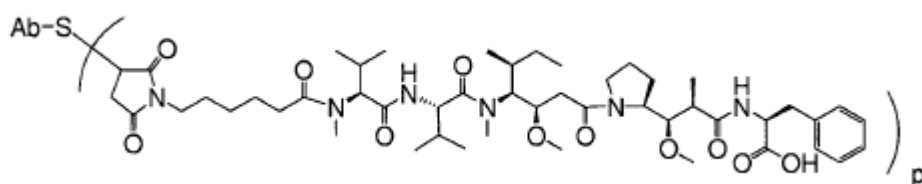


Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE

381



Ab-BMPEO-DM1

hvor Val er valin og Cit er citrullin, og/eller

5 (viii) L er MC-val-cit-PAB eller MC.

12. Farmasøytisk sammensetning omfattende et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller immunkonjugatet ifølge et hvilket som helst av krav 9 til 11 og et farmasøytisk akseptabelt bærestoff, eventuelt i kombinasjon med et cytotoxisk stoff.

13. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller immunkonjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 11, for anvendelse som legemiddel, eventuelt i kombinasjon med et cytotoxisk stoff.

15

14. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller immunkonjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 11, for anvendelse i en

fremgangsmåte for behandling av en proliferativ forstyrrelse, eventuelt i kombinasjon med et cytotoxisk stoff.

15. Antistoff eller immunkonjugat for anvendelse som et legemiddel ifølge krav 14, hvor nevnte proliferative forstyrrelse er kreft, eventuelt lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og kappecellelymfom.
16. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller immunkonjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 11, for anvendelse til inhibering av veksten av en tumorcelle som uttrykker CD79b.
17. Fremgangsmåte for bestemmelse av forekomsten av et CD79b-protein i en prøve antatt å inneholde nevnte protein, idet nevnte fremgangsmåte omfatter eksponering av nevnte prøve for et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller immunkonjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 11, og bestemmelse av binding av nevnte antistoff eller immunkonjugat til nevnte CD79b-protein i nevnte prøve, hvor binding av antistoffet til nevnte protein er indikativt for forekomsten av nevnte protein i nevnte prøve, hvor prøven eventuelt er fra en pasient antatt å ha en B-celleproliferativ forstyrrelse, eventuelt lymfom, non-Hodgkins-lymfom (NHL), aggressivt NHL, residivert aggressivt NHL, residivert indolent NHL, refraktært NHL, refraktært indolent NHL, kronisk lymfatisk leukemi (CLL), småcellet lymfatisk lymfom, leukemi, hårcelleleukemi (HCL), akutt lymfatisk leukemi (ALL) og kappecellelymfom.
18. In vitro fremgangsmåte for inhibering av veksten av en celle som uttrykker CD79b, idet nevnte fremgangsmåte omfatter å bringe nevnte celle i kontakt med et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller immunkonjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 11, hvor nevnte celle eventuelt er en B-celle og/eller en tumorcelle.
19. Fremgangsmåte for påvisning av forekomst av CD79b i en biologisk prøve omfattende å bringe den biologiske prøven i kontakt med et anti-CD79b-antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller et immunkonjugat ifølge et

hvilket som helst av kravene 9 til 11 under betingelser som gir mulighet for binding av anti-CD79b-antistoffet til CD79b, og påvisning av om et kompleks er dannet mellom anti-CD79b-antistoffet eller immunkonjugatet og CD79b.

Sekvensliste

<110> Genentech, Inc.

<120> ANTI-CD79B ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF USE

<130> RXT/FP6787212

<140> Unknown, filed herewith.

< 141> 2008-07-15

<150> 08781859.7

< 151> 2008-07-15

<150> PCT/US2008/070088

< 151> 2008-07-15

<150> US 60/950, 052

< 151> 2007-07-16

<150> US 61/025,137

< 151> 2008-01-31

<150> US 61/032,790

< 151> 2008-02-29

<150> US 61/054, 709

< 151> 2008-05-20

<160> 310

<210> 1

< 211> 1270

< 212> DNA

< 213> Homo sapiens

<400> 1

caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50
 tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100
 aggctggcgt tgtctcctgt gcccagccac tggatggtag cgttgctgct 150
 gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccgggtacc 200
 ggaatcccaa aggtagtgtc tgttcgcgga tctggcagag cccacgtttc 250
 atagccagga aacggggcctt cacgggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300
 cgcctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350
 cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaagagtc ccagaacgaa 400
 tctctcgcca ccctcaccat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450
 ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctccggaggtc taccagggct 500
 gcggcacaga gctgcgagtc atgggattca gcaccttggc acagctgaag 550
 cagaggaaca cgctgaagga tggatatcat atgatccaga cgctgctgat 600
 catcctcttc atcatcgtgc ctatcttcct gctgctggac aaggatgaca 650
 gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgagggcct ggacattgac 700

 cagacagcca cctatgagga catagtgcg ctgcggacag gggaagtga 750
 gtggctctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800
 tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850
 gctcatggcc caacccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900
 gccaccaga gctgccattt gtctccagcc cctgggtccc agctcttgcc 950
 aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttgg agggagtctt 1000
 ctggggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050
 cccacacat gggatggggg aggcagagac tggccagag cccgcaaagt 1100
 gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccattggacc 1150
 aactggggcc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200
 tcccacccca gggaggccct ggcctccagt gccttcccc gtggaataaa 1250
 cgggtgtgtcc tgagaaacca 1270

<210> 2

< 211> 229

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 2

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

Pro Gly Gln Glu

<210> 3

< 211> 929

< 212> DNA

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Light Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 3

```

cactcccagc tccaactgca cctcgggttct atcgattgaa ttccaccatg 50
ggatggtcac 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 atctgggatc ccagccaggt 300
ttagtggcag tgggtctggg acagacttca ccctcaacat ccatcctgtg 350
gaggaggagg atgctgcaac ctattactgt cagcaaagta atgaggatcc 400
gtcacagttc ggggcaggca ccgagctgga actcaaacgg accgtggctg 450
caccatctgt ctcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 500
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa 550
agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 600
gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 650
ctgacgtgta gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga 700
agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc ttcaacaggg 750
gagagtgtta agcttggccg ccatggccca acttgtttat tgcagcttat 800
aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 850
tttttcaactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcata aatgtatctt 900
atcatgtctg gatcgggaat taattcggc 929

```

<210> 4

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Light Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 4

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

<210> 5

< 211> 1469

< 212> DNA

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Heavy Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 5

```

tcggttctat cgattgaatt ccaccatggg atgggtcatgt atcatccttt 50
ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt cagaagtcca gctgcagcag 100
tctggggctg aactgatgaa gcctggggcc tcagtgaaga taccctgcaa 150
ggctactggc tacacattca gtagttactg gatagagtgg gtaaagcaga 200

```

```

ggcctggaca tggccttgag tggattggag agattttacc tggaggtggt 250
gataactaact acaatgagat ttccaagggc 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 ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 550
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt 600
cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg actgtgccct 650
ctagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 700
agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 750
tcacacatgc ccacgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag 800
tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 850
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt 900
caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa 950
agccgcggga ggagcagtag 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 tgcttggtca aaggcttcta 1200
tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1250
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1300
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 1350
ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccactac acgcagaaga 1400
gcctctccct gtctccgggt aaatgagtgc gacggcccta gagtcgacct 1450
gcagaagctt ggccgccat 1469

```

<210> 6

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Heavy Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 6

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

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

Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser
 65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
 95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 125 130 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 155 160 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 170 175 180

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> PRT

< 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

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Ala Asp

```


	185		190		195
His Thr Tyr Glu	Gly Leu Asp Ile Asp	Gln Thr Ala Thr Tyr	Glu		
	200		205		210
Asp Ile Val Thr	Leu Arg Thr Gly Glu	Val Lys Trp Ser Val	Gly		
	215		220		225
Glu His Pro Gly	Gln Glu				
	230				

<210> 8

< 211> 228

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 8

10

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

Gly Gln Glu

<210> 9

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 9

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

```

Ile Lys Arg

<210> 10

< 211> 111

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Variable domain of Light Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 10

```

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

```

```

Glu Leu Glu Leu Lys Arg
          110

```

<210> 11

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Variable Domain of LIght Chain of Humanized Antibody Graft (huMA79b graft)

<400> 11

```

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

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
          35           40           45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
          50           55           60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          65           70           75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
          80           85           90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
          95          100          105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          110

```

<210> 12

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys 5 10

<210> 13

< 211> 113

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 13

13

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

<210> 14

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> Variable domain of Heavy Chain of Chimeric Antibody (chMA79b)

<400> 14

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

<210> 15

14

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Variable Domain of Heavy Chain of Humanized Antibody Graft (huMA79b
graft)

<400> 15

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

<210> 16

< 211> 16

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 16

Ala	Arg	Ser	Glu	Asp	Arg	Tyr	Arg	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala	Cys	1	5	10	15
Lys																		

<210> 17

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 17

Lys Ala Ser Lys Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 18

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 18

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
5

<210> 19

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 19

Ala Ala Ser Asn Leu Lys Ser
5

<210> 20

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 20

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Leu Thr
5

<210> 21

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 21

Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Leu Thr
5

<210> 22

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 22

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Arg
5

<210> 23

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 23

Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser
5

<210> 24

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 24

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Asn
5

<210> 25

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 25

Ala Ala Arg Lys Leu Lys Arg
5

<210> 26

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 26

Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Arg
5

<210> 27

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 27

Ala Ala Arg Lys Leu Lys Ser
5

<210> 28

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 28

Ala Ala Arg Lys Leu Ala Ser
5

<210> 29

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 29

Ala Ala Gly Ile Leu Ala Arg
5

<210> 30

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 30

Ala Ala Arg Lys Leu Arg Ser
5

<210> 31

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 31

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Ser
5

<210> 32

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 32

Ala Ala Arg His Leu Lys Arg
5

<210> 33

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 33

Ala Ser Arg Tyr Leu Ser Arg
5

<210> 34

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 34

Ala Gly Ser Lys Leu Leu Arg
5

<210> 35

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 35

Ala Ala Ser Asn Arg Lys Ser
5

<210> 36

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 36

Ala Ala Ser Lys Leu Gly Ser
5

<210> 37

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 37

Ala Ala Arg Tyr Leu Arg Arg
5

<210> 38

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 38

Ala Ala Arg Arg Leu Arg Thr
5

<210> 39

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 39

Ala Ala Arg Arg Leu Gly Arg
5

<210> 40

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 40

Ala Ala Arg Gln Arg Lys Arg
5

<210> 41

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 41

Ala Ala Arg Lys Leu Leu Arg
5

<210> 42

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 42

Ala Ala Arg Lys Leu Lys Asn
5

<210> 43

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 43

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Thr
5

<210> 44

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 44

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Gly
5

<210> 45

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 45

Ala Ala Arg Lys Leu Ala Arg
5

<210> 46

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 46

Gln Gln Ser Asn Ala Asp Pro Leu Thr
5

<210> 47

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 47

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Leu Thr

<210> 48

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 48

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 49

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 49

Gln Gln Ser Asn Asp Asp Pro Leu Thr
5

<210> 50

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 50

Gln Gln Ser Asn Leu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 51

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 51

Asn Asn Ser Asn Gly Asp Pro Leu Asn
5

<210> 52

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 52

Gln Pro Asp Asn Glu Ala Pro Arg Thr
5

<210> 53

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 53

Asp Gln Arg Asn Ala Asp Pro Leu Thr
5

<210> 54

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 54

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 55

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 55

Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Gln
5 10

26

<210> 56

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 56

Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

<210> 57

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 57

Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr	Arg	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

<210> 58

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 58

Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Arg	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

<210> 59

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 59

Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

<210> 60

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 60

Pro	Tyr	Ser	Leu	Cys	Thr	Tyr	Phe	Ile	Asp
				5					10

<210> 61

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 61

Gly	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

<210> 62

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 62

Gly	Tyr	Pro	Phe	Gly	Arg	Tyr	Trp	Val	Asn
				5					10

<210> 63

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 63

Gly Tyr Thr Phe Lys Lys Tyr Trp Ile Glu
 5 10

<210> 64

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 64

Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gln
 5 10

<210> 65

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 65

Gly Tyr Pro Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu
 5 10

<210> 66

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 66

Gly Tyr Pro Val Gly Arg Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 67

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 67

Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 68

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 68

Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 69

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 69

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu Ser
5 10

30

<210> 70

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 70

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

<210> 71

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 71

Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

<210> 72

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> sequence is synthesized

<400> 72

Gly	Tyr	Thr	Phe	Arg	Arg	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

<210> 73

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 73

Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 74

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 74

Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 75

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 75

Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 76

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 76

Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Tyr Trp Leu Gln
5 10

<210> 77

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 77

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 78

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 78

Gly Tyr Pro Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 79

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 79

Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 80

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 80

Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 81

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 81

Gly Tyr Pro Phe Arg Gly Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 82

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 82

Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 83

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 83

Gly Tyr Pro Phe Asn Gly Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 84

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 84

Gly Tyr Asn Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ser
5 10

<210> 85

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 85

Gly Phe Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 86

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 86

Gly Phe Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 87

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 87

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp
5 10

<210> 88

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 88

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
5 10

<210> 89

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 89

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Lys Leu Asp
5 10

<210> 90

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 90

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp
5 10

<210> 91

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 91

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Tyr	Phe	Asp
				5					10

<210> 92

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 92

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Phe	Cys	Leu	Asp
				5					10

<210> 93

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 93

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Leu	Asp
				5					10

<210> 94

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 94

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
5 10

<210> 95

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 95

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Lys Leu Asp
5 10

<210> 96

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 96

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Phe Asp
5 10

<210> 97

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 97

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
5 10

<210> 98

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 98

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Phe	Ser
				5					10

<210> 99

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 99

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Val	Leu	Asp
				5					10

<210> 100

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 100

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Leu	Asp
				5					10

<210> 101

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 101

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Phe Asp
5 10

<210> 102

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 102

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Phe Leu Asp
5 10

<210> 103

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 103

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp
5 10

<210> 104

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 104

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
5 10

40

<210> 105

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 105

Cys	Thr	Arg	Arg	Arg	Pro	Val	Cys	Leu	Asp
				5					10

<210> 106

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Humanized Antibody Variant

<400> 106

Cys	Thr	Arg	Arg	Ile	Pro	Val	Tyr	Phe	Asp
				5					10

<210> 107

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 107

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Phe	Asp
				5					10

<210> 108

< 211> 87

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 108

41

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

<210> 109

< 211> 81

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 109

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

<210> 110

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 110

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

42

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

<210> 111

< 211> 79

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 111

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

<210> 112

< 211> 86

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 112

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

43

<210> 113

< 211> 81

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 113

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

<210> 114

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 114

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

<210> 115

< 211> 79

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

44

<400> 115

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

<210> 116

< 211> 87

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 116

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

<210> 117

< 211> 81

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 117

45

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

<210> 118

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 118

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

<210> 119

< 211> 79

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 119

46

```

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

```

Thr Val Ser Ser

<210> 120

< 211> 87

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 120

```

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

```

<210> 121

< 211> 81

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 121

```

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

```

47

```

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

```

<210> 122

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 122

```

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

```

<210> 123

< 211> 86

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 123

48

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

<210> 124

< 211> 81

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 124

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

<210> 125

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 125

49

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

<210> 126

< 211> 79

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 126

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

Thr Val Ser Ser

<210> 127

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 127

50

```

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

```

<210> 128

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 128

```

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

```

<210> 129

< 211> 80

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 129

```

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

```

51

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> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 130

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

<210> 131

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> HVR1-LC of huMA79b graft

<400> 131

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 132

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> HVR2-LC of huMA79b graft

<400> 132

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 133

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> HVR3-LC of huMA79b graft

<400> 133

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 134

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> HVR1-HC of huMA79b graft

<400> 134

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 135

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> HVR2-HC of huMA79b graft

<400> 135

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 136

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> HVR3-HC of huMA79b graft

<400> 136

Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr
5 10

<210> 137

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b. V28)

<400> 137

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 138

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b. V28)

<400> 138

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
5 10

<210> 139

< 211> 23

< 212> PRT

54

< 213> Homo sapiens

<400> 139

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
				20			

<210> 140

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 140

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 141

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 141

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 142

< 211> 11

<212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 142

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

<210> 143

< 211> 25

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

55

<400> 143

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 144

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 144

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10

<210> 145

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 145

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 1 5 10 15

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

<210> 146

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 146

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 5 10

<210> 147

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> FR3-HC Composite of Humanized Antibody Variants

<220>

< 221> Xaa

< 222> 6

< 223> Xaa is A or R

<220>

< 221> Xaa

< 222> 8

< 223> Xaa is T or N

<220>

< 221> Xaa

< 222> 13

< 223> Xaa is A or L

<400> 147

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

<210> 148

< 211> 31

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 148

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

Ala

<210> 149

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

57

<400> 149

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu
1				5					10					15

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

Ala Arg

<210> 150

< 211> 31

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 150

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu
1				5					10					15

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

Ser

<210> 151

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 151

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu
1				5					10					15

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

Ser Arg

<210> 152

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 152

58

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 153

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-LC Humanized Antibody variant huMA79b.v17)

<400> 153

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 154

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-LC of Humanized Antibody variant (huMA79b.v17)

<400> 154

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

<210> 155

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

59

<400> 155

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

<210> 156

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 156

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 157

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 157

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 5

<210> 158

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 158

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
 5

<210> 159

< 211> 106

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 159

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

Cys

$\langle 210 \rangle$ 160

 $\langle 211 \rangle$ 25

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 160

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

<210> 161

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 161

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 162

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 162

Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

<210> 163

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 163

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 164

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 164

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

62

<210> 165

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 165

Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Ile
1				5					10				15	

Phe Lys Gly

<210> 166

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR-H3 of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 166

Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Phe	Asp	Tyr
				5				10	

<210> 167

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> CH1-HC of Humanized Antibody Variet (huMA79b.v17)

<400> 167

63

```

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

```

Thr His Thr

<210> 168

< 211> 221

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 168

```

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

```

64

Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	65	70	75
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	80	85	90
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	95	100	105
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	110	115	120
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	125	130	135
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	140	145	150
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	155	160	165
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	170	175	180
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	185	190	195
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	200	205	210
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly					215	220	

<210> 169

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> LC-HC Variety Domain of Humanized Antibody Variet (huMA79b.v17)

<400> 169

65

```

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

```

<210> 170

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v17)

<400> 170

```

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

```

<210> 171

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 171

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 172

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 172

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 173

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 173

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 174

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 174

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 175

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 175

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 176

 $\langle 211 \rangle$ 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 176

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 177

 $\langle 211 \rangle$ 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 177

68

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 178

< 211> 106

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 178

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
65 70 75

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
80 85 90

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
95 100 105

Cys

<210> 179

< 211> 25

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 179

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 180

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 180

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 5 10

<210> 181

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 181

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

<210> 182

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 182

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 183

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 183

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 5 10

<210> 184

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 184

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
 1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 185

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 185

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 186

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> CH1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 186

71

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

Thr His Thr

<210> 187

< 211> 221

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 187

Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	1	5	10	15
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	20	25	30	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	35	40	45	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	50	55	60	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	65	70	75	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	80	85	90	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	95	100	105	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	110	115	120	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	125	130	135	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	140	145	150	

```

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
155                      160                      165

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
170                      175                      180

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
185                      190                      195

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
200                      205                      210

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
215                      220

```

<210> 188

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> LC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 188

```

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

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35     40     45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50     55     60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65     70     75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80     85     90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95     100    105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

```

<210> 189

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v18)

<400> 189

```

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

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

```

<210> 190

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 190

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1           5           10           15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
          20

```

<210> 191

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 191

74

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 192

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 192

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

<210> 193

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 193

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

<210> 194

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 194

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 195

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 195

<210> 196

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 196

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 197

< 211> 106

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 197

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

76

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

Cys

<210> 198

< 211> 25

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 198

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 199

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 199

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 5 10

<210> 200

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 200

77

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

<210> 201

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 201

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				5					10	

<210> 202

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 202

Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

<210> 203

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR2-HLC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 203

Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Ile
1				5					10					15

Phe Lys Gly

<210> 204

78

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 204

Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp	Tyr
				5					10

<210> 205

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> CH1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v28)

<400> 205

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
1				5					10					15

Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
				20					25					30

Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
				35					40					45

Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				50					55					60

Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				65					70					75

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

80

85

90

Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
				95					100					105

Thr His Thr

<210> 206

< 211> 221

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.V28)

<400> 206

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

<210> 207

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> LC-variable domain of (huMA79b.v28)

<400> 207

80

```

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

```

<210> 208

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody (huMA79b.v28)

<400> 208

```

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

```

<210> 209

< 211> 23

81

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 209

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
				20			

<210> 210

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 210

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Phe	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 211

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 211

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 212

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

$\langle 400 \rangle$ 212

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 213

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 213

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 214

 $\langle 211 \rangle 7$

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR2-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 214

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 215

 $\langle 211 \rangle$ 9

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR3-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 215

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 216

< 211> 106

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> CL1-LC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 216

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

Cys

<210> 217

< 211> 25

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 217

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

<210> 218

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 218

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 219

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 219

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

<210> 220

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> FR4-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 221

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 221

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 222

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR2-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 222

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 223

 $\langle 211 \rangle$ 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> HVR3-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 223

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
5 10

<210> 224

 $\langle 211 \rangle$ 108

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle$

< 223> CH1-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 224

86

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

Thr His Thr

<210> 225

< 211> 221

< 212> PRT

< 213> Artificial Sequence

<220>

< 223> Fc-HC of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 225

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

87

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> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> LC -Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 226

88

```

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

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

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          110

```

<210> 227

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> HC-Variable Domain of Humanized Antibody Variant (huMA79b.v32)

<400> 227

```

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          110          115

```

<210> 228

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-huMA79b.v17-HC(All8C) Variant - HC

<400> 228

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

Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Phe	Asp	
				95					100					105	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	
				110					115					120	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	
				125					130					135	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
				140					145					150	
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
				155					160					165	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
				170					175					180	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	
				185					190					195	
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
				200					205					210	
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
				215					220					225	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
				230					235					240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				275					280					285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
				290					295					300	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
				305					310					315	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
				320					325					330	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
				335					340					345	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
				350					355					360	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
				365					370					375	
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	

91

				380					385					390
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				395					400					405
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				410					415					420
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
				425					430					435
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
				440					445					

<210> 229

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-huMA79b.v17-HC(All8C) Variant - LC

<400> 229

92

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 230

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-huMA79b.v18-HC(All8C) Variant - HC

<400> 230

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser		20	25	30	
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		35	40	45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr		50	55	60	
Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser		65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp		80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp		95	100	105	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr		110	115	120	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr		125	130	135	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe		140	145	150	
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		155	160	165	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr		170	175	180	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr		185	190	195	
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys		200	205	210	
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		215	220	225	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		230	235	240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg		245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		260	265	270	

94

```

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                               310                               315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
320                               325                               330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
335                               340                               345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
350                               355                               360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365                               370                               375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380                               385                               390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395                               400                               405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410                               415                               420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425                               430                               435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440                               445

```

<210> 231

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-huMA79b.v18-HC(A118C) Variant - LC

<400> 231

95

```

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

```

```

          95          100          105

```

```

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
          110          115          120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
          125          130          135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
          140          145          150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
          155          160          165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          170          175          180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
          185          190          195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
          200          205          210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          215

```

<210> 232

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-huMA79b.v28-HC(All8C) Variant - HC

<400> 232

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	20	25	30	
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	50	55	60	
Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp	95	100	105	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	110	115	120	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	125	130	135	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	140	145	150	

Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
				155					160					165	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
				170					175					180	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	
				185					190					195	
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
				200					205					210	
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
				215					220					225	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
				230					235					240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				275					280					285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
				290					295					300	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
				305					310					315	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
				320					325					330	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
				335					340					345	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
				350					355					360	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
				365					370					375	
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
				380					385					390	
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
				395					400					405	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
				410					415					420	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
				425					430					435	
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly					
				440					445						

<210> 233

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-huMA79b.v28-HC(A118C) Variant - LC

<400> 233

```

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

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

Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35           40           45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 50           55           60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65           70           75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80           85           90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
 95           100          105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110          115          120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125          130          135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140          145          150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155          160          165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170          175          180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185          190          195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200          205          210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

```

<210> 234

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-chMA79b- LC(V205C) Variant - HC

<400> 234

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 80 85 90
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
 95 100 105
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 110 115 120
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 125 130 135
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 140 145 150
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 155 160 165
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 170 175 180
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 185 190 195
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 200 205 210
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 215 220 225
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 320 325 330
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 335 340 345
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 350 355 360

100

Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	365	370	375
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	380	385	390
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	395	400	405
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	410	415	420
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	425	430	435
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly					440	445	

<210> 235

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-chMA79b- LC(V205C) Variant - LC

<400> 235

101

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

<210> 236

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-chMA79b- HC(A118C) Variant - HC

<400> 236

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

103

	245		250		255
Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser His Glu Asp			
	260	265			270
Pro Glu Val Lys	Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280			285
Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	290	295			300
Arg Val Val Ser	Val Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp Leu Asn			
	305	310			315
Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
	320	325			330
Pro Ile Glu Lys	Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	335	340			345
Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser	Arg Glu Glu Met Thr Lys			
	350	355			360
Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	365	370			375
Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn	Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	380	385			390
Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	395	400			405
Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
	410	415			420
Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn His			
	425	430			435
Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu Ser	Pro Gly			
	440	445			

<210> 237

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> ThioMAb-chMA79b- HC(A118C) Variant - LC

<400> 237

104

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

<210> 238

< 211> 893

< 212> DNA

< 213> Macaca fascicularis

<400> 238

tcatggtgat ggtgatgatg accggtacgc gtagaatcga gaccgaggag 50
 agggtttaggg ataggcttac cttcgaaccg cgggccctct agactcgagc 100
 ggccgccact gtgctggata tctgcagaat tgcccttggg gacagagcag 150
 tgaccatggc caggctggcg ttgtctcctg tgtccagcca ctggctggtg 200
 gcgttgctgc tgctgctctc agcagctgag ccagtgccag cagccaaatc 250
 agaggacctg taccogaatc ccaaaggtag tgcttgttct cggatctggc 300
 agagcccacg tttcatagcc aggaacggg gcttcacggt gaaaatgcac 350
 tgctacgtga ccaacagcac cttcagcatc gtgagctggc tccggaagcg 400
 ggagacggac aaggagcccc aacaggtgaa cctggagcag ggccacatgc 450
 atcagaccca aaacagctct gtcaccacc tcacatcca agacatccg 500
 tttgaggaca acggcatcta cttctgtcag caggagtgc gcaagacctc 550
 ggaggcttac cggggtgcg gcacggagct gcgagtcag gggttcagca 600
 ccttggcaca gctgaagcag aggaacacgc tgaaggatgg catcatcatg 650
 atccagacgc tgctgatcat cctcttcac atcgtgccca tcttcctgct 700
 gctggacaag gatgacagca aggccggcat ggaggaagat cacacctacg 750

 agggcctgga cattgaccag acggccacct acgaggacat agtgacgctg 800
 cggacagggg aagtgaagtg gtctgtgggt gagcaccag gtcaggagtg 850
 agagccagga cctccccacg gcctgggtgc aggtcccca gcc 893

<210> 239

< 211> 231

< 212> PRT

< 213> Macaca fascicularis

<400> 239

106

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

<210> 240

< 211> 800

< 212> DNA

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10)- LC

<400> 240

107

```

acctcgggttc tategattga attccaccat gggatgggtca tgtatcatcc 50
tttttctagt agcaactgca actggagtagc attcagatat cgtgctgacc 100
caatctccac cctctttggc tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatata 150
ctgcagagcc agtgaaagtg ttgatagtta tggcaaaact tttatgcact 200
ggcaccagca gaaaccagga cagccacca aactcctcat ctatcgtgta 250
tccaacctag aatctgggat ccctgccagg ttcagtggca gtgggtcaag 300
gacagacttc accctcacca ttaatcctgt ggaggctgat gatgttgcaa 350
cctattactg tcagcaaagt aatgaggatc cgttcacgtt cggtgagggc 400
accaagctgg aaatcaaagc gaccgtggct gcaccatctg tcttcatctt 450
cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc 500
tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 550
aacgccctcc aatcggttaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 600
caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 650
actacagaaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 700
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aagcttgccc 750
gccatggccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 800

```

<210> 241

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10)- LC

<400> 241

```

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

```

108

	95	100	105
Thr Lys Leu Glu	Ile Lys Arg Thr Val	Ala Ala Pro Ser Val	Phe
	110	115	120
Ile Phe Pro Pro	Ser Asp Glu Gln Leu	Lys Ser Gly Thr Ala	Ser
	125	130	135
Val Val Cys Leu	Leu Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala Lys	Val
	140	145	150
Gln Trp Lys Val	Asp Asn Ala Leu Gln	Ser Gly Asn Ser Gln	Glu
	155	160	165
Ser Val Thr Glu	Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser Leu	Ser
	170	175	180
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His Lys	Val
	185	190	195
Tyr Ala Cys Glu	Val Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro Val	Thr
	200	205	210
Lys Ser Phe Asn	Arg Gly Glu Cys		
	215		

<210> 242

< 211> 1500

< 212> DNA

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10)- LC

<400> 242

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 ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 500
 tgcctggta aggactactt cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc 550
 aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtctc 600
 caggacteta ctccctcagc agcgtggtga ctgtgccctc tagcagcttg 650
 ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa 700
 ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc 750

caccgtgccc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc 800
 ccccaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc 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 aggttcttat ccagcgaca 1200
 tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1250
 acgcctcccg tgctggactc cgaaggctcc ttcttctctc acagcaagct 1300
 caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1350
 tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1400
 tctccgggta aatgagtgcg acggccctag agtcgacctg cagaagcttg 1450
 gccgccatgg cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa 1500

<210> 243

< 211> 441

< 212> PRT

110

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Chimeric anti-cyno CD79b (ch10D10) - LC

<400> 243

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	1	5	10	15
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	20	25	30	
Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asn	Ile	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	50	55	60	
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ser	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Met	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	95	100	105	
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	110	115	120	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	125	130	135	

111

Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	140	145	150
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	155	160	165
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	170	175	180
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	185	190	195
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	200	205	210
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	215	220	225
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	230	235	240
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	245	250	255
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	260	265	270
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	290	295	300
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	305	310	315
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	320	325	330
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	335	340	345
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	350	355	360
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	365	370	375
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	380	385	390
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	395	400	405
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	410	415	420
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	425	430	435
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly										440		

<210> 244

< 211> 441

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-MAb-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) Variant - HC

<400> 244

Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	1	5	10	15
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	20	25	30	
Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asn	Ile	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	50	55	60	
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ser	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Met	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	95	100	105	
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	110	115	120	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	125	130	135	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	140	145	150	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	155	160	165	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	170	175	180	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	185	190	195	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	200	205	210	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	215	220	225	
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	230	235	240	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	245	250	255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	260	265	270	
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285	

113

```

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
320                               325                               330

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
335                               340                               345

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
350                               355                               360

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
365                               370                               375

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
380                               385                               390

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
395                               400                               405

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
410                               415                               420

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
425                               430                               435

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

```

<210> 245

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-MAb-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) Variant - LC

<400> 245

114

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

<210> 246

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Albumin binding peptide

<400> 246

Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Arg	Leu	Met	Glu	1	5	10	15
Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp	Glu	Asp	Asp	Phe	20	25	30	

115

<210> 247

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Albumin binding peptide

<400> 247

Gln	Arg	Leu	Met	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu
1				5					10					15
Trp	Glu	Asp	Asp	Phe										
				20										

<210> 248

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Albumin binding peptide

<400> 248

Gln	Arg	Leu	Ile	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu
1				5					10					15
Trp	Glu	Asp	Asp	Phe										

<210> 249

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Albumin binding peptide

<400> 249

Arg	Leu	Ile	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp
1				5					10					15
Glu	Asp	Asp												

<210> 250

< 211> 11

116

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Albumin binding peptide

<400> 250

Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp
				5					10	

<210> 251

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 251

Glu	Val	Gln	Leu	Cys	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
				5					10

<210> 252

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 252

Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Cys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr
				5					10	

<210> 253

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

117

<400> 253

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Cys	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
				5					10	

<210> 254

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 254

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Cys	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
				5					10	

<210> 255

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 255

Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
				5					10	

<210> 256

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 256

Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				5					10	

<210> 257

< 211> 11

118

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 257

Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Cys	Glu	Val	His	Asn	Ala
				5					10	

<210> 258

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b HC-variant

<400> 258

Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Cys	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				5					10	

<210> 259

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 259

Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Cys	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				5					10	

<210> 260

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

119

<400> 260

Glu	Val	Gln	Leu	Cys	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu
				5					10

<210> 261

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 261

Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Tyr	Thr
				5					10	

<210> 262

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 262

Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Cys	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
				5					10	

<210> 263

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 263

Thr	Ser	Val	Thr	Val	Cys	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
				5					10	

<210> 264

< 211> 11

120

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 264

Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro

<210> 265

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 265

Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 266

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 266

Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
5 10

<210> 267

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

121

<400> 267

Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
 5 10

<210> 268

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b HC-variant

<400> 268

Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
 5 10

<210> 269

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 269

Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Pro Gly
 5 10

<210> 270

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 270

Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Thr Gly Tyr Ser
 5 10

<210> 271

< 211> 11

122

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 271

Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Cys	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr
					5				10	

<210> 272

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 272

Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Cys	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
					5				10	

<210> 273

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 273

Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
					5				10	

<210> 274

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

123

<400> 274

Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				5					10	

<210> 275

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-HC-variant

<400> 275

Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Cys	Glu	Val	His	Asn	Ala
				5					10	

<210> 276

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 276

Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Cys	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				5					10	

<210> 277

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 277

Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Cys	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				5					10	

<210> 278

< 211> 11

124

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 278

Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Cys	Gly	Asp	Arg	Val	Thr
				5					10	

<210> 279

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 279

Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
				5					10	

<210> 280

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 280

Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Cys	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
				5					10	

<210> 281

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b LC-variant

125

<400> 281

Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Cys	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys
				5					10	

<210> 282

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 282

Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Cys	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
				5					10	

<210> 283

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 283

Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				5					10	

<210> 284

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-huMA79b LC-variant

<400> 284

Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				5					10	

<210> 285

< 211> 11

126

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 285

Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Cys	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr
				5					10	

<210> 286

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 286

Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
				5					10	

<210> 287

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 287

Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Cys	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
				5					10	

<210> 288

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b LC-variant

127

<400> 288

Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Cys	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys
				5					10	

<210> 289

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 289

Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Cys	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
				5					10	

<210> 290

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 290

Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				5					10	

<210> 291

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio-chMA79b LC-variant

<400> 291

Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				5					10	

<210> 292

< 211> 11

128

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 292

Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Cys	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr
				5					10	

<210> 293

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 293

Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
				5					10	

<210> 294

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 294

Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Cys	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
				5					10	

<210> 295

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

129

<400> 295

Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Cys	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys
				5					10	

<210> 296

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 296

Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Cys	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
				5					10	

<210> 297

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 297

Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				5					10	

<210> 298

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC-variant

<400> 298

Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				5					10	

<210> 299

< 211> 441

130

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b-LC(V205C) Variant - HC

<400> 299

Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	1	5	10	15
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	20	25	30	
Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asn	Ile	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	50	55	60	
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ser	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Met	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	95	100	105	
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	110	115	120	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	125	130	135	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	140	145	150	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	155	160	165	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	170	175	180	

131

Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
				185					190					195	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	
				200					205					210	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
				215					220					225	
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
				230					235					240	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
				245					250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
				260					265					270	
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
				275					280					285	
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
				290					295					300	
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
				305					310					315	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				320					325					330	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				335					340					345	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				350					355					360	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
				365					370					375	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
				380					385					390	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
				395					400					405	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
				410					415					420	
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
				425					430					435	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly										
				440											

<210> 300

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C) Variant - LC

<400> 300

132

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

<210> 301

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> anti-cynoCD79b (ch10D10) - variable of HC

<400> 301

133

```

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
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
          35           40           45
Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr
          50           55           60
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser

```

```

          65           70           75

```

```

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp
          80           85           90
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly
          95          100          105
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
          110

```

<210> 302

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> anti-cynoCD79b (ch10D10) - variable domain of LC

<400> 302

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1           5           10           15
Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
          20           25
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

134

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Light chain of huMA79bv.17

<400> 303

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

<210> 304

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Heavy chain of huMA79bv.17

<400> 304

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

136

Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro Leu Ala	Pro Ser Ser Lys Ser Thr	125	130	135
Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly Cys	Leu Val Lys Asp Tyr Phe	140	145	150
Pro Glu Pro Val	Thr Val Ser Trp Asn	Ser Gly Ala Leu Thr Ser	155	160	165
Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	170	175	180
Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val Pro	Ser Ser Ser Leu Gly Thr	185	190	195
Gln Thr Tyr Ile	Cys Asn Val Asn His	Lys Pro Ser Asn Thr Lys	200	205	210
Val Asp Lys Lys	Val Glu Pro Lys Ser	Cys Asp Lys Thr His Thr	215	220	225
Cys Pro Pro Cys	Pro Ala Pro Glu Leu	Leu Gly Gly Pro Ser Val	230	235	240
Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys Asp	Thr Leu Met Ile Ser Arg	245	250	255
Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser His Glu Asp	260	265	270
Pro Glu Val Lys	Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu Val His	275	280	285
Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	290	295	300
Arg Val Val Ser	Val Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp Leu Asn	305	310	315
Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro Ala	320	325	330
Pro Ile Glu Lys	Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg Glu	335	340	345
Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser	Arg Glu Glu Met Thr Lys	350	355	360
Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	365	370	375
Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn	Gly Gln Pro Glu Asn Asn	380	385	390
Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe	395	400	405
Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln Gly	410	415	420
Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn His	425	430	435
Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu Ser	Pro Gly			

440

445

<210> 305

< 211> 218

137

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Light chain of huMA79bv.18

<400> 305

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

<210> 306

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Heavy chain of huMA79bv.18

<400> 306

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser		20	25	30	
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		35	40	45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr		50	55	60	
Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser		65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp		80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp		95	100	105	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr		110	115	120	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr		125	130	135	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe		140	145	150	
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		155	160	165	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr		170	175	180	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr		185	190	195	
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys		200	205	210	
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		215	220	225	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		230	235	240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg		245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		275	280	285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		290	295	300	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		305	310	315	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala		320	325	330	

139

```

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
      335              340              345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
      350              355              360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
      365              370              375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      380              385              390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      395              400              405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
      410              415              420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      425              430              435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      440              445

```

<210> 307

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Light chain of huMA79bv.28

<400> 307

140

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

<210> 308

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Heavy chain of huMA79bv.28

<400> 308

141

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	

142

Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	215	220	225
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	230	235	240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	290	295	300
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	320	325	330
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	335	340	345
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	350	355	360
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	365	370	375
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	380	385	390
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	395	400	405
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	410	415	420
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	425	430	435
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly					440	445	

<210> 309

< 211> 218

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Light chain of huMA79bv.32

<400> 309

143

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

<210> 310

< 211> 446

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Heavy chain of huMA79bv.32

<400> 310

144

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				

145

	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			

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGACGTTACACGTTTTCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCCTGGACCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACCTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCTCTCCCGCAACCAC
TCCCACCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGAATAAACGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

FIG. 1

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMH CYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGETLRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Signalsekvens.

aminosyre 1-28.

Transmembrant domene.

aminosyre 5-25, 159-179.

Immunoglobulindomene.

aminosyre 58-128.

Immunreseptortyrosinbasert aktiveringsmotiv.

aminosyre 193-213.

N-glykosyleringssted.

aminosyre 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.

Proteinkinase C-fosforyleringssted.

aminosyre 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.

Kaseinkinase II-fosforyleringssted.

aminosyre 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.

Tyrosinkinasefosforyleringssted.

aminosyre 113-120.

N-myristoyleringssted.

aminosyre 40-45, 118-123.

FIG. 2

KIMÆR ANTI-HUMAN CD79b (chMA79b)-LETTKJEDE

CACTCCCAGCTCCAAGTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGT
 ATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCGTGCTGACCCAATC
 TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAA
 GTGTTGATTATGATGGTGATAGTTTTTTGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC
 AAACCTCTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAG
 TGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
 ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGCTCACGTTCCGGGGCAGGCACCGAGCTGGAATC
 AAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
 TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGT
 GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC
 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
 CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGAGTGTTAAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT
 TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAG
 TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC

*FIG. 3***KIMÆR ANTI-HUMAN CD79B (CHMA79B)-LETTKJEDE**

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSTFLNWFYQKPGQPPKLFITYAASNLES
 GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 4

KIMÆR ANTI-HUMAN CD79b (chMA79b)-TUNGKJEDE

TCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**AT**GGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAA
 CTGCAACTGGAGTACATTTCAGAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGATGAAGCCT
 GGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTTCAGTAGTTACTGGATAGA
 GTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAGGTG
 GTGATACTAATAACAATGAGATTTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCC
 AACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGCATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTAC
 AAGACGAGTACCGGTTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCT
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA
 CAAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGA
 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
 CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
 TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT**TGA**
 GTGCGACGGCCCTAGAGTGCACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT

FIG. 5**KIMÆR ANTI-HUMAN CD79b (chMA79b)-TUNGKJEDE**

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNY
 NEIFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGGQTSVTVSS**AST**
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG. 6

VL-sekvenser

Kabatnr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat - CDR L1
Choithia - CDR L1
Kontakt - CDR L1

hukl	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q
MA79b	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
huMA79b-poding	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
huMA79b.v17	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
huMA79b.v18	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
huMA79b.v28	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
huMA79b.v32	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

Al 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Kabatnr. 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR L2
Choithia - CDR L2
Kontakt - CDR L2

hukl	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
MA79b	Q	K	P	G	Q	P	K	L	F	I	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	S	S	L	Q	P
huMA79b-poding	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
huMA79b.v17	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
huMA79b.v18	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
huMA79b.v28	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
huMA79b.v32	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	F	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

B1 2 3 4 5 6 7

FIG. 7A

VL-sekvenser

Kabatnr. 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Kontakt - CDR L3

hukl	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 9
MA79b	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	L	T	F	G	A	G	T	E	L	E	L	K	R	SEQ ID NO: 10
huMA79b-poding	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 11
huMA79b.v17	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 169
huMA79b.v18	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 188
huMA79b.v28	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 207
huMA79b.v32	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 226

C1 2 3 4 5 6 7

8 9

FIG. 7B

VL-sekvenser

Kabatnr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41

Kabat - CDR H1

Chothia - CDR H1

Kontakt - CDR H1

humIII	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	
MA79b	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	N	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	E	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	W	V	K	Q	R	P
huMA79b-poding	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	W	V	R	Q	A	P	
huMA79b.v17	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	W	V	R	Q	A	P	
huMA79b.v18	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	W	V	R	Q	A	P	
huMA79b.v28	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	W	V	R	Q	A	P	
huMA79b.v32	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	W	V	R	Q	A	P	

D1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Kabatnr. 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

Kabat - CDR H2

Chothia - CDR H2

Kontakt - CDR H2

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	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	K	A	T	F	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L
huMA79b-poding	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	
huMA79b.v17	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	
huMA79b.v18	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	
huMA79b.v28	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	
huMA79b.v32	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	L	P	G	G	G	D	T	N	Y	N	E	I	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	

6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

81 2 3 4 5

E1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

FIG. 8A

VL-sekvenser

Kabatnr. 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



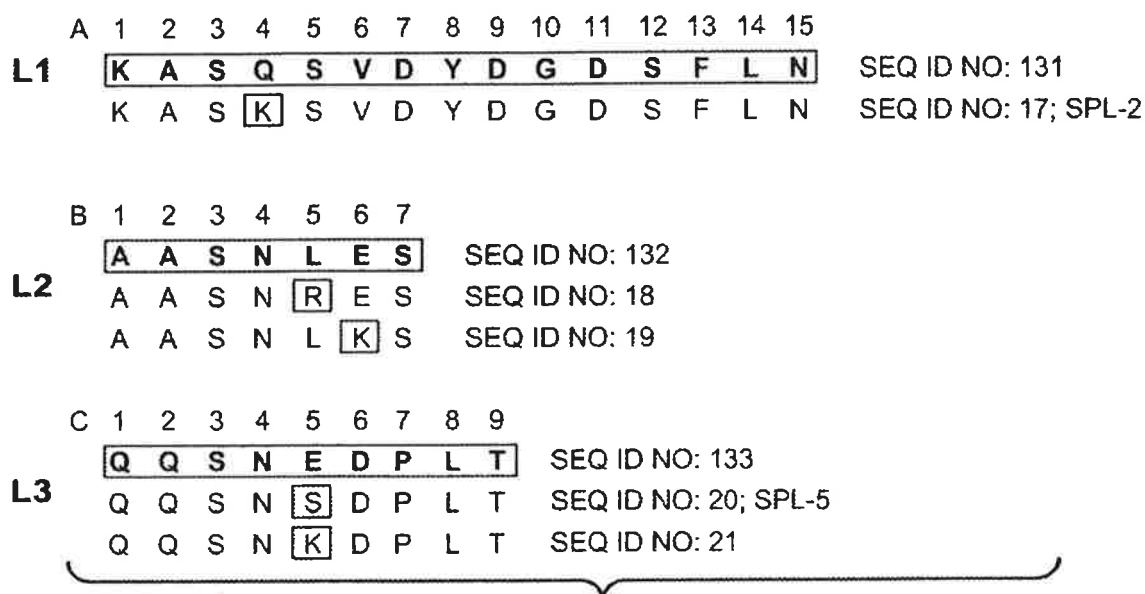
humIII	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	V	P	V	Y	F	D	Y	W	G
MA79b	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	R	R	V	P	V	Y	F	D	Y	W	G
huMA79b-poding	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	R	V	P	V	Y	F	D	Y	W	G
huMA79b.v17	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	R	V	P	V	Y	F	D	Y	W	G
huMA79b.v18	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	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	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	R	V	P	I	R	L	D	Y	W	G

F1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Kabatnr. 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
huMA79b-poding	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

FIG. 8B

**FIG. 9**

MA79b-variant IgG	Biacore KD (nM)		Immobilisert antigen
	Fab	IgG	
MA79b	200	2	hu CD79b.ecd-Fc
		4.7	hu CD79b.ecd
huMA79b-poding		261	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2-2	44		hu CD79b.ecd-Fc
	39	43	hu CD79b.ecd
hu MA79b H3-10		29	hu CD79b.ecd
hu MA79b H1-6		42	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2/H3		2	hu CD79b.ecd-Fc
		3	hu CD79b.ecd
		1	16mer-peptid

FIG. 11

		Murine strukturenheter til stede										Endringer for stabilitet i VL				CDR-H3-sekv.	Bivalent bindingsfold	
huMA79 FW-variant IgG		VL	48	67	69	71	73	75	78	80		28	29	94	95		Kd _{variant}	Kd _{klinær}
huMA79-poding							71	73		78						wt		56
Allstruktur		4 47	48	67	69	71	73	75	78	80						wt		1
1			48			71	73		78							wt		9.4
2		47				71	73		78							wt		18
3				67	69	71	73	75	78	80						wt		5.5
4					69	71	73	75	78	80						wt		12
5			48	67	69	71	73	75	78	80						wt		3.5
6			48	67		71	73		78							wt		7.6
7			48		69	71	73		78							wt		3.5
8			48	67	69	71	73		78							wt		1.7
9			48	67	69	71	73		78	80						wt		1.8
10			48	67	69	71	73	75	78							wt		NA
11			48	67	69	71	73	75	78	80						H3-10		0.6
12			48	67	69	71	73		78							H3-10		0.5
13		47	48		69	71	73		78							wt		1.8
14	4		48		69	71	73		78							wt		1.1
15	4 47		48		69	71	73		78							wt		0.8
16	4		48	67		71	73		78							wt		1.6
17	4		48	67	69	71	73		78							wt		1.0
18	4		48	67	69	71	73		78							H3-10		0.4
19	4		48	67	69	71	73		78			S		E		H3-10		NDB
20	4		48	67	69	71	73		78			S		E		H3-10		NDB
21	4		48	67	69	71	73		78			E		N		H3-10		NDB
22	4		48	67	69	71	73		78			E		N		H3-10		NDB
23	4 47		48	67	69	71	73		78			S		E		H3-10		25
24	4 47		48	67	69	71	73		78			S		E		H3-10		NDB
25	4 47		48	67	69	71	73		78			E		N		H3-10		NDB
26	4 47		48	67	69	71	73		78			E		N		H3-10		NDB
27	4 47		48	67	69	71	73		78			E		N		H3-10	svært svak	
28	4		48	67	69	71	73		78			E		N		H3-10	0.8	
29			48	67	69	71	73		78							H3-10		
30	4 47		48	67	69	71	73		78				A			H3-10	1.3	
31	4 47		48	67	69	71	73		78			S		A		H3-10	1.0	
32	4 47		48	67	69	71	73		78			S		A		H3-10	1.6	
33	4 47		48	67	69	71	73		78						A	H3-10	svært svak	
34	4 47		48	67	69	71	73		78				E			H3-10	NDB	

FIG. 12

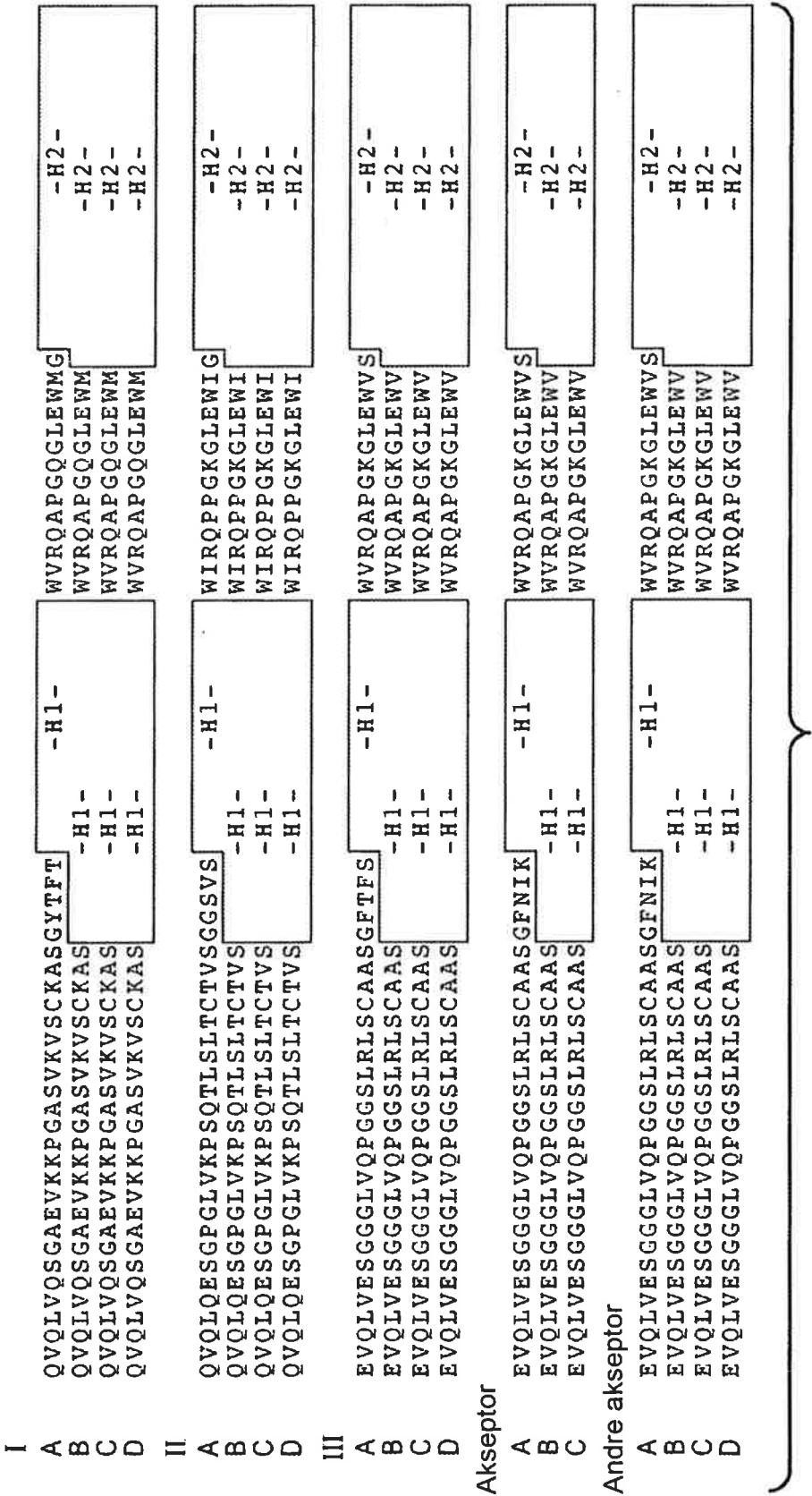
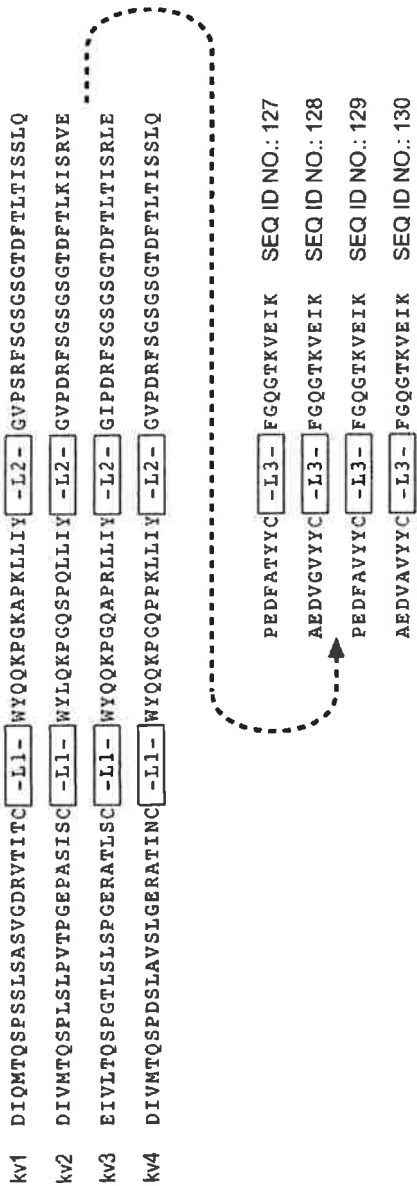


FIG. 13A

I	
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED ¹ TAVYYCAR
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED ² TAVYYCAR
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED ³ TAVYYCA
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED ⁴ TAVYYC
II	
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD ¹ TAVYYCAR
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD ² TAVYYCAR
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD ³ TAVYYCA
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD ⁴ TAVYYC
III	
A	RFTISRDN ¹ SKNTLYLQMN ² SLRAED ³ TAVYYCAR
B	RFTISRDN ² SKNTLYLQMN ³ SLRAED ⁴ TAVYYCAR
C	RFTISRDN ³ SKNTLYLQMN ⁴ SLRAED ⁵ TAVYYCA
D	RFTISRDN ⁴ SKNTLYLQMN ⁵ SLRAED ⁶ TAVYYC
Akseptor	
A	RFTISAD ¹ TSKNTAYLQMN ² SLRAED ³ TAVYYC ^{SR}
B	RFTISAD ² TSKNTAYLQMN ³ SLRAED ⁴ TAVYYC ^{SR}
C	RFTISAD ³ TSKNTAYLQMN ⁴ SLRAED ⁵ TAVYYC ^{SR}
Andre akseptor	
A	RFTISAD ¹ TSKNTAYLQMN ² SLRAED ³ TAVYYCAR
B	RFTISAD ² TSKNTAYLQMN ³ SLRAED ⁴ TAVYYCAR
C	RFTISAD ³ TSKNTAYLQMN ⁴ SLRAED ⁵ TAVYYCA
D	RFTISAD ⁴ TSKNTAYLQMN ⁵ SLRAED ⁶ TAVYYC

FIG. 13B



14 / 44

FIG. 14

A. huMA70b.v17-lettkjede

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC (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: KASQSVDDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 156)
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 157)
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 158)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)

Lett kjede

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 303)

LC-variabelt domene:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSFLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 169)

B. huMA79b.v17-tungkjede

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: TRRVVYFDY (SEQ ID NO: 166)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 167)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 168)

Tung kjede:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 304)

HC-variabelt domene:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 170)

FIG. 15

A. huMA70b.v18-lettkjede

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 171)
 FR2-LC: WYQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 172)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 173)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 174)
 HVR1-LC: KASQSVDDYDGSFLN (SEQ ID NO: 175)
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 176)
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 177)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 178)

Lett kjede:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGSFLNWWYQKPGKAPKLLIYAASNLES
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNREGC (SEQ ID NO: 305)

LC-variabelt domene:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGSFLNWWYQKPGKAPKLLIYAASNLES
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 188)

B. huMA79b.v18-tungskjede

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: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 186)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVQLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 187)

Tung kjede:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVQLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 306)

HC-variabelt domene:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 189)

FIG. 16

A. huMA70b.v28-lettkjede

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 190)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 191)
 FR3-LC: GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (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: QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 196)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 197)

Lett kjede:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWKYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 307)

B. huMA79b.v28-tungkjede

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 198)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 199)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 200)
 FR4-HC: WGQGTTLTVSS (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: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 205)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 206)

Tung kjede:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 308)

FIG. 17

A. huMA70b.v32-lettkjede

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 209)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLFYI (SEQ ID NO: 210)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (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: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 216)

Lett kjede:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSDYSGDSFLNWKYQQKPGKAPKLFYIYAASNLESGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 309)

LC-variabelt domene:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSDYSGDSFLNWKYQQKPGKAPKLFYIYAASNLESGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 226)

B. huMA79b.v32-tungkjede

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 217)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 218)
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 219)
 FR4-HC: WGQGLVTVSS (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: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPA
 VLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 224)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 225)

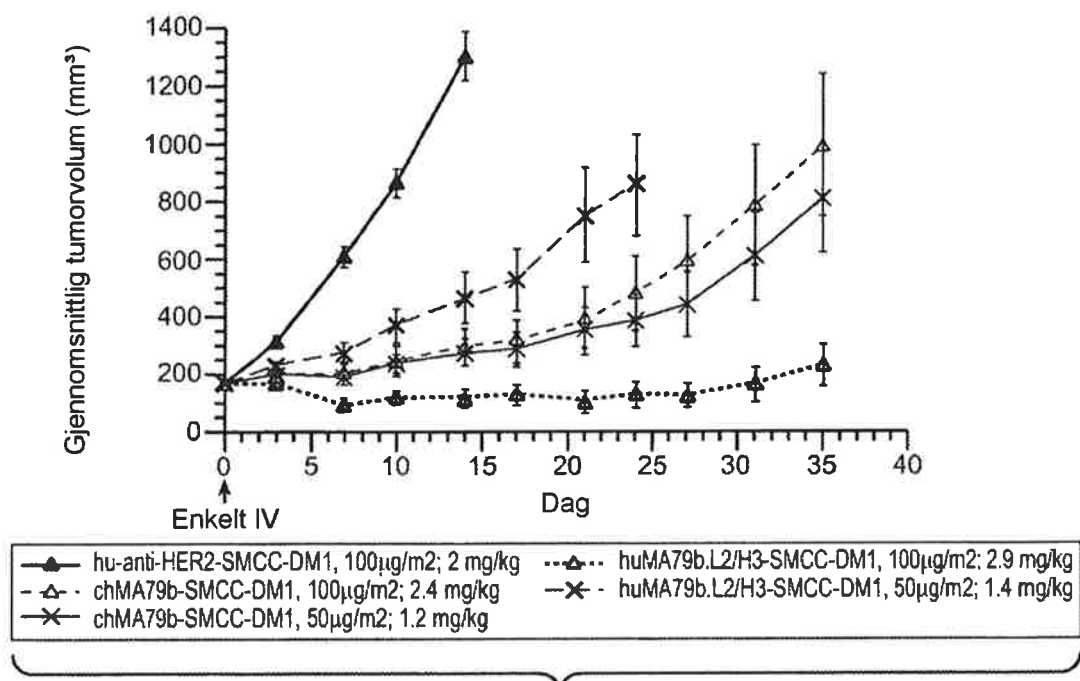
Tung kjede:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 310)

HC-variabelt domene:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 227)

FIG. 18

**FIG. 20**

21

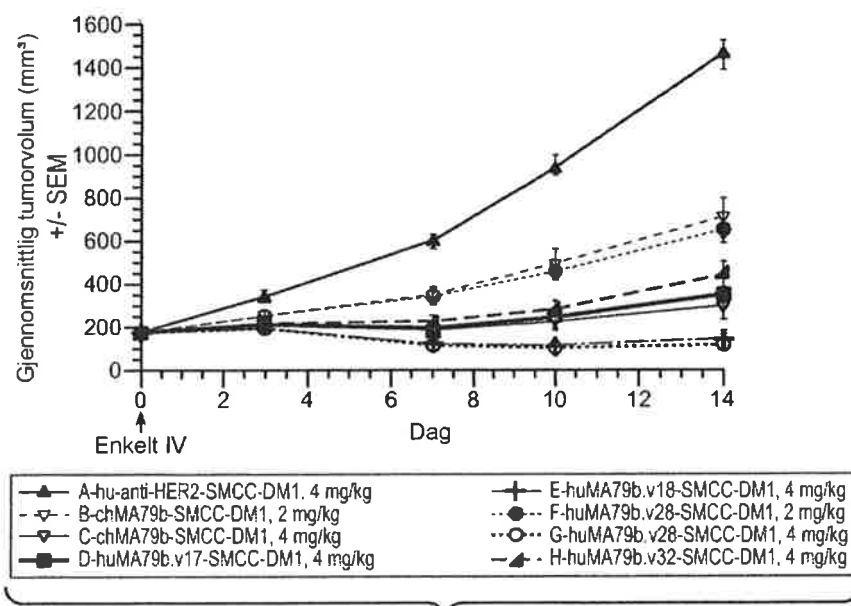


FIG. 21A

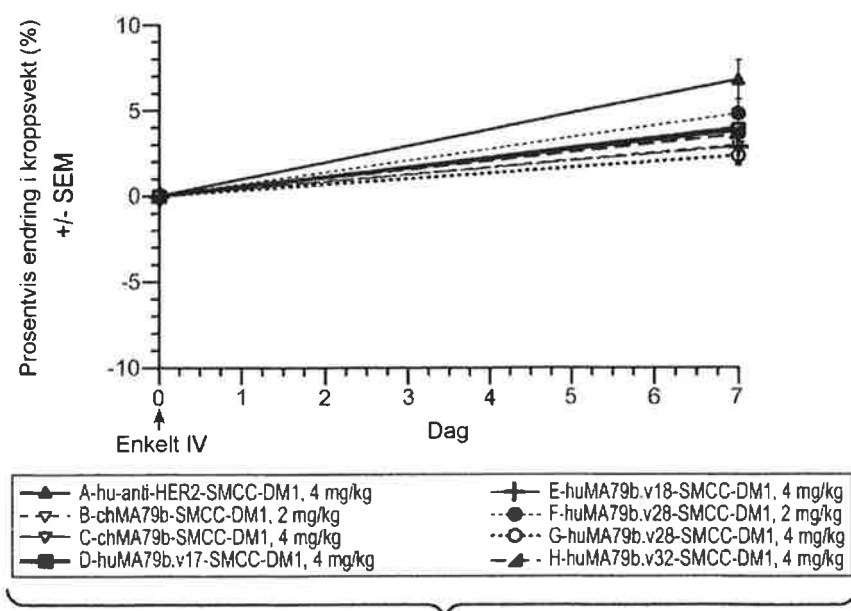
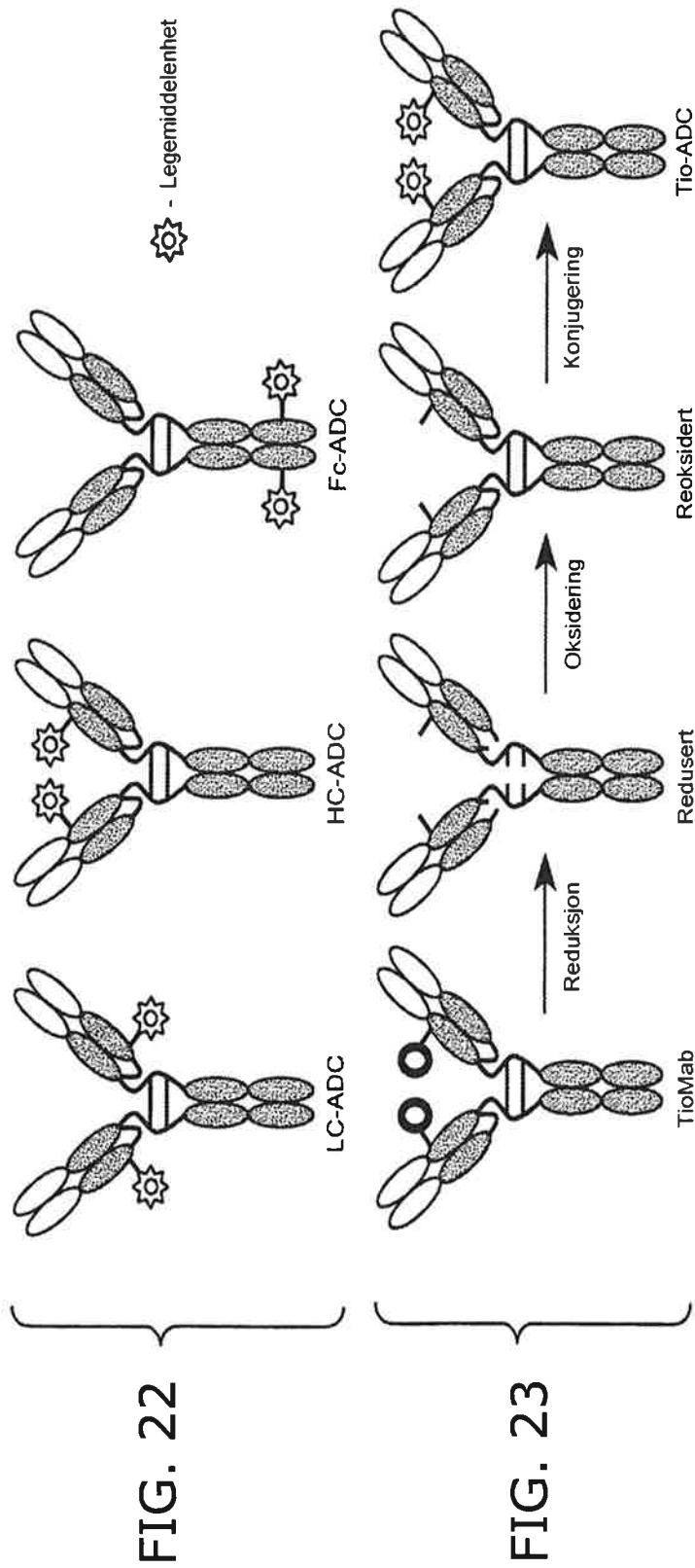


FIG. 21B



Anti-CD79b A118C huMA79b.v17-cysteinkonstruert tungkjede-tioMab**A. Sekvens i lett kjede****Tio-huMA79b.v17-HC-A118C (LC)**

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGSFLNWWYQKPGKAPKLLIYAASNLESQVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 229)

B. Sekvens i tung kjede**Tio-huMA79b.v17-HC-A118C (HC)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSAD
 TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWQGTLTVTSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 228)

FIG. 24**Anti-CD79b A118C huMA79b.v18-cysteinkonstruert tungkjede-tioMab****A. Sekvens i lett kjede****Tio-huMA79b.v18-HC-A118C (LC)**

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGSFLNWWYQKPGKAPKLLIYAASNLESQVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 231)

B. Sekvens i tung kjede**Tio-huMA79b.v18-HC-A118C (HC)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLTVTSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 230)

FIG. 25

Anti-CD79b A118C huMA79b.v28-cysteinkonstruert tungkjede-tioMab**A. Sekvens i lett kjede**

Tio-huMA79b.v28-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWyQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 233)

B. Sekvens i tung kjede

Tio-huMA79b.v28-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPFIRLDYWGQGTLLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 232)

FIG. 26**Anti-CD79b V205C chMA79b-cysteinkonstruert tungkjede-tioMab****A. Sekvens i lett kjede**

Tio-chMA79b-LC-V205C (LC)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDGDFLNWyQQKPGQPPKLFIIYAASNLESGIPARFSGS
 GSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 235)

B. Sekvens i tung kjede

Tio-hMA79b-LC-V205C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKAT
 FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 234)

FIG. 27

Anti-CD79b A118C chMA79b-cysteinkonstruert tungkjede-tioMab**A. Sekvens i lett kjede****Tio-chMA79b-HC-A118C (LC)**

DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSEFLNWIYQQKPGQPPKLFITAAASNLSEGIPTARFSGS
GSGLTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 237)

B. Sekvens i tung kjede**Tio-chMA79b-HC-A118C (HC)**

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNRYNEIFKGGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGGTSVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRNQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 236)

FIG. 28

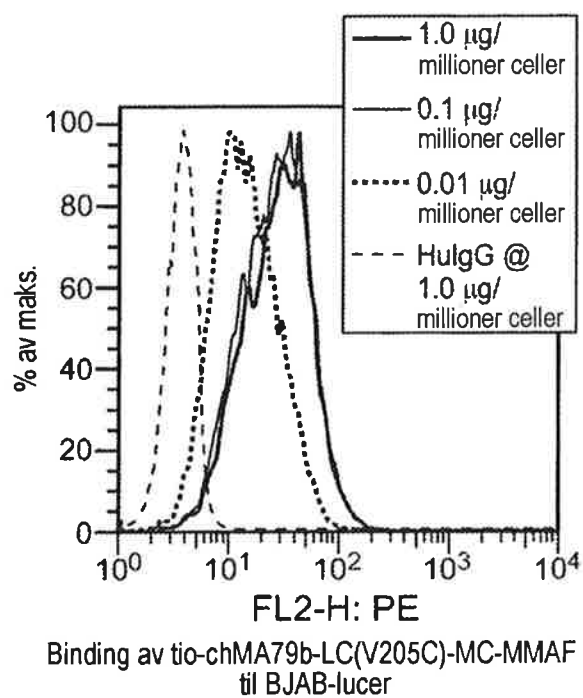


FIG. 29A

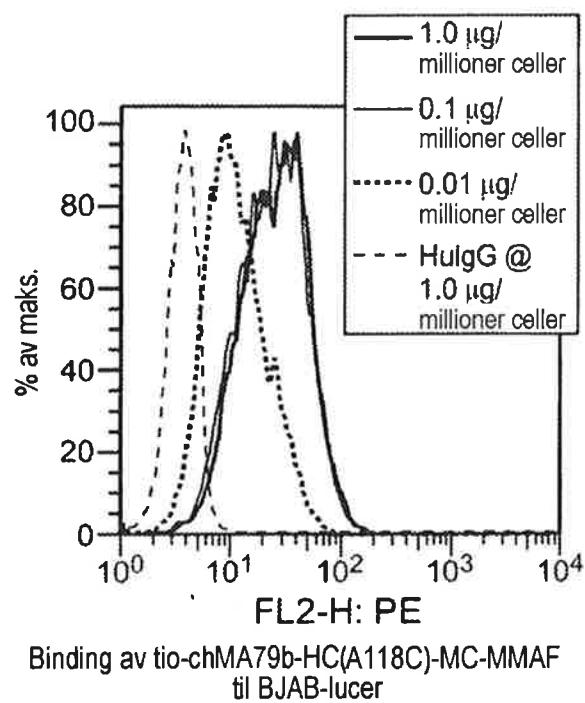


FIG. 29B

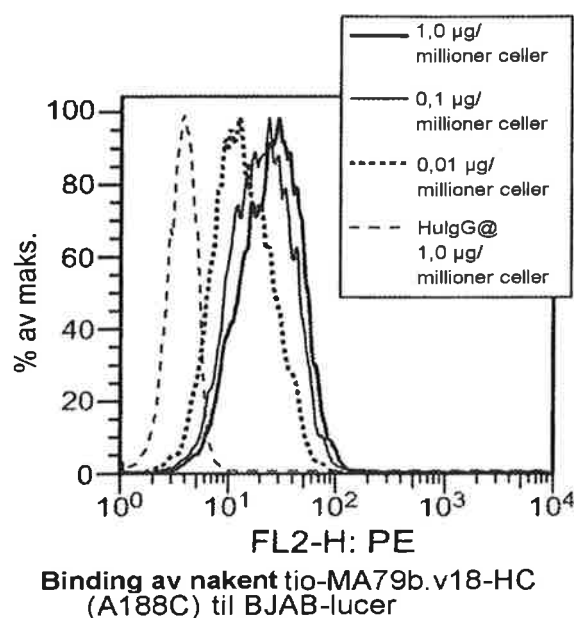


FIG. 30A

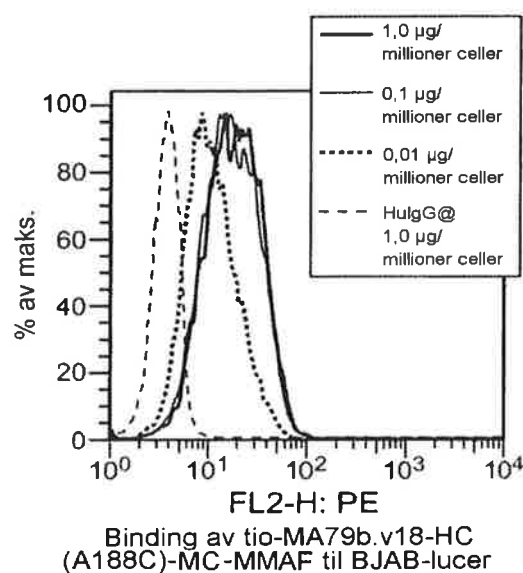


FIG. 30B

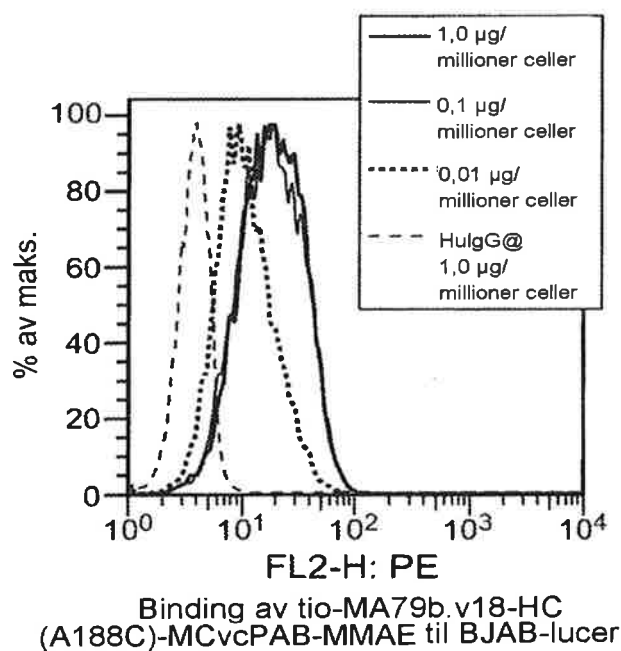


FIG. 30C

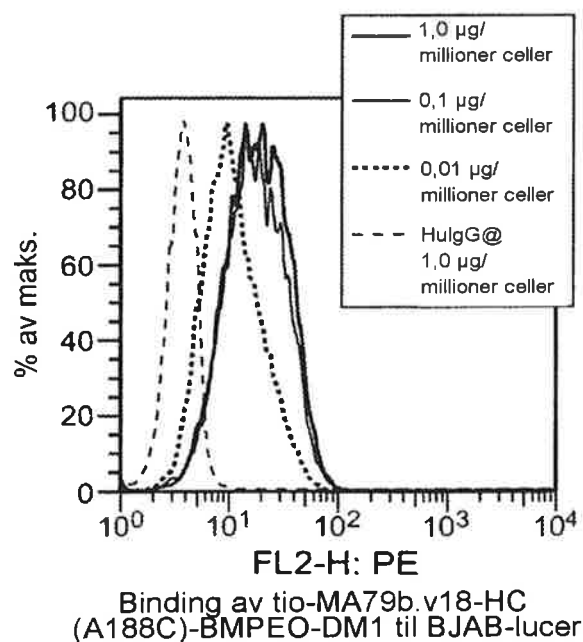
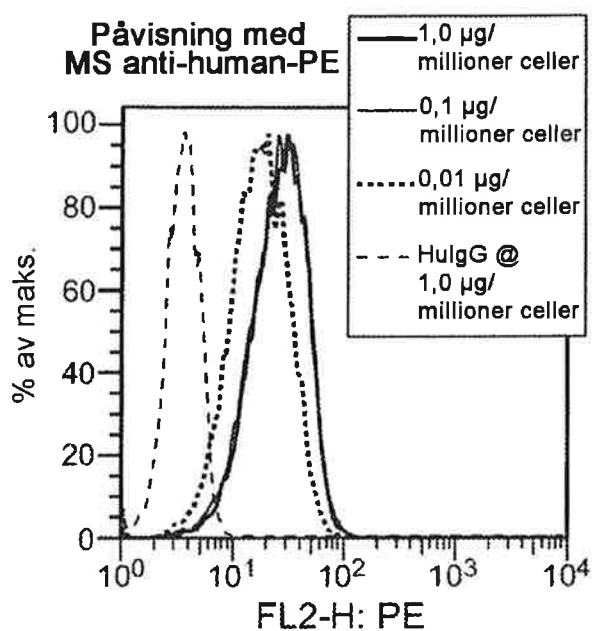
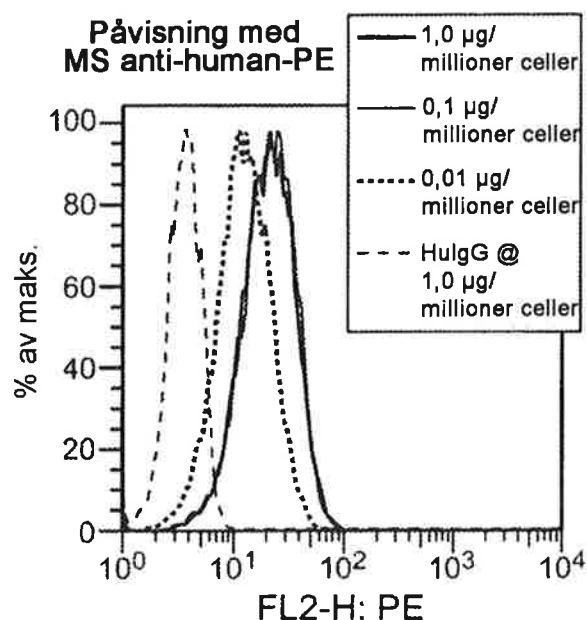


FIG. 30D



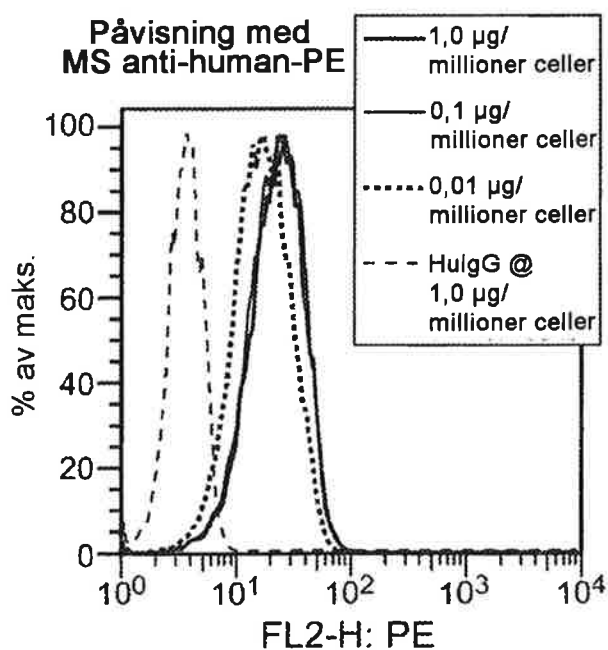
Binding av nakent tio-MA79b.v28-HC
(A188C) til BJAB-lucifer

FIG. 31A



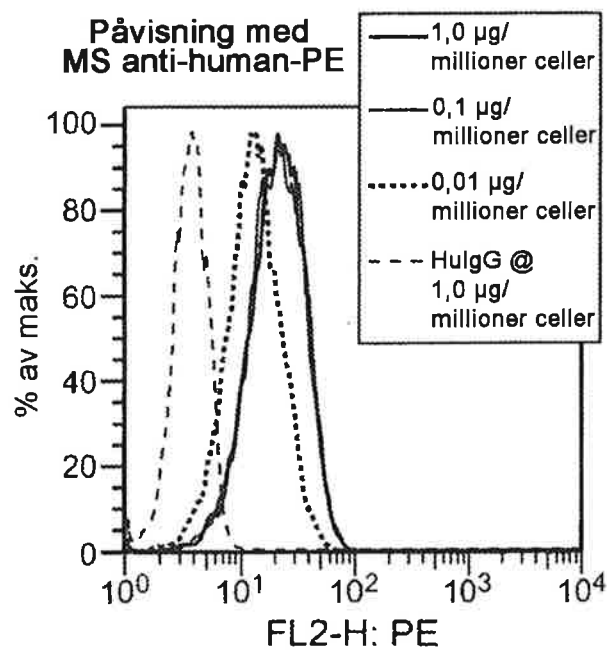
Binding av tio-MA79b.v28-HC
(A188C)-MCvcPAB-MMAE til BJAB-lucifer

FIG. 31B



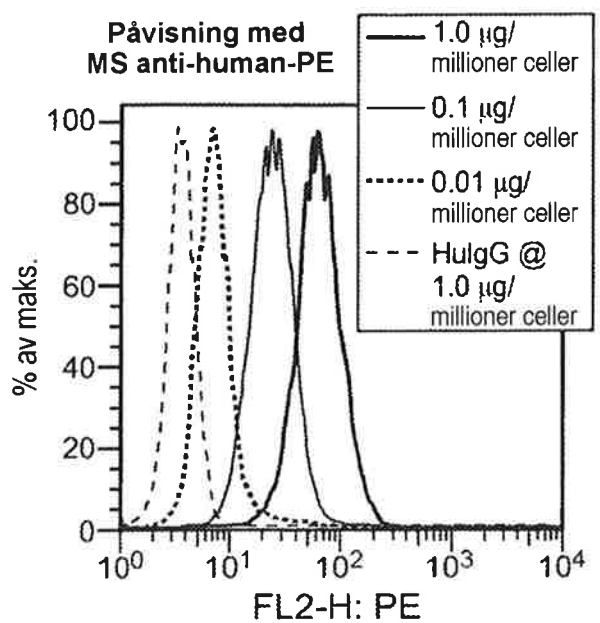
Binding av tio-MA79b.v28-HC
(A188C)-BMPEO-DM1 til BJAB-lucifer

FIG. 31C



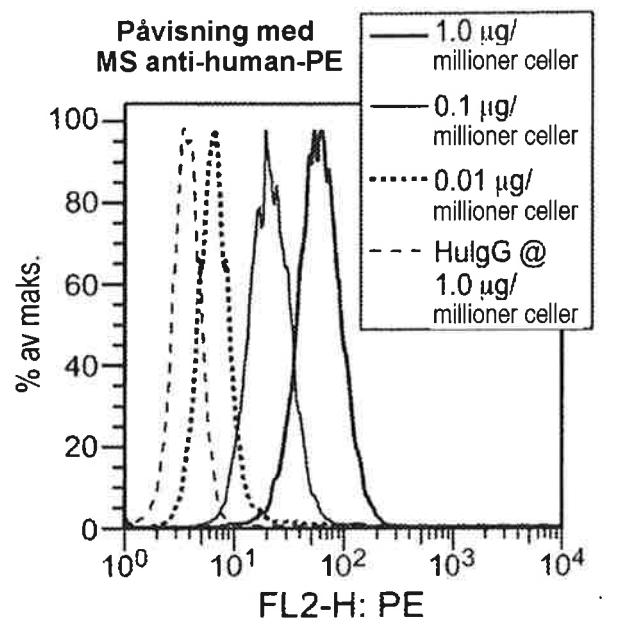
Binding av tio-MA79b.v28-HC
(A188C)-MC-MMAF til BJAB-lucifer

FIG. 31D



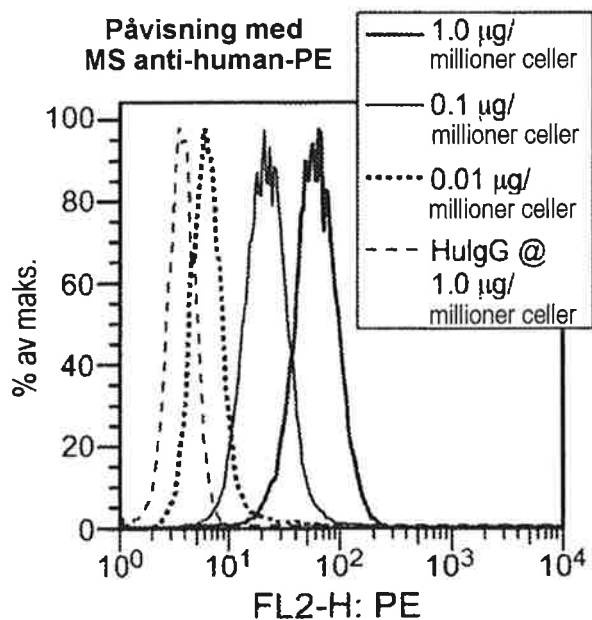
Binding av nakent tio-anti-cynoCD79b
(ch10D10)-HC(A188C) til
BJAB-cynoCD79b-celler

FIG. 32A



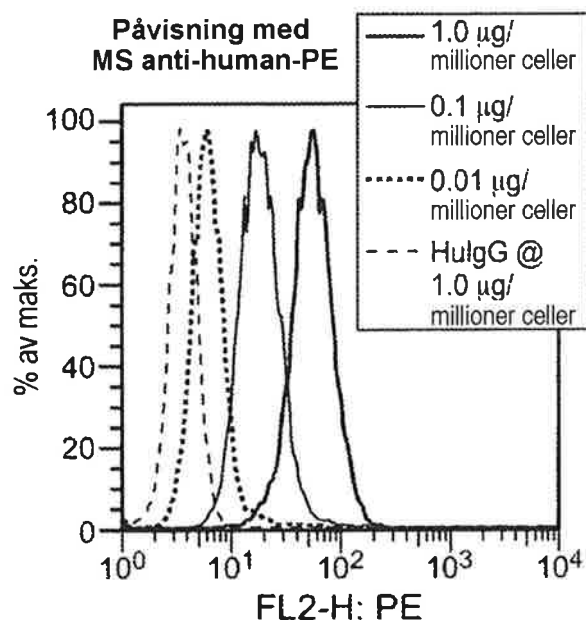
Binding av tio-anti-cynoCD79b
(ch10D10)-HC(A188C)-MCvcPAB-MMAE til
BJAB-cynoCD79b-celler

FIG. 32B



Binding av tio-anti-cynoCD79b
(ch10D10)-HC(A188C)-BMPEO-DM1 til
BJAB-cynoCD79b-celler

FIG. 32C



Binding av tio-anti-cynoCD79b
(ch10D10)-HC(A188C)-MC-MMAF til
BJAB-cynoCD79b-celler

FIG. 32D

30

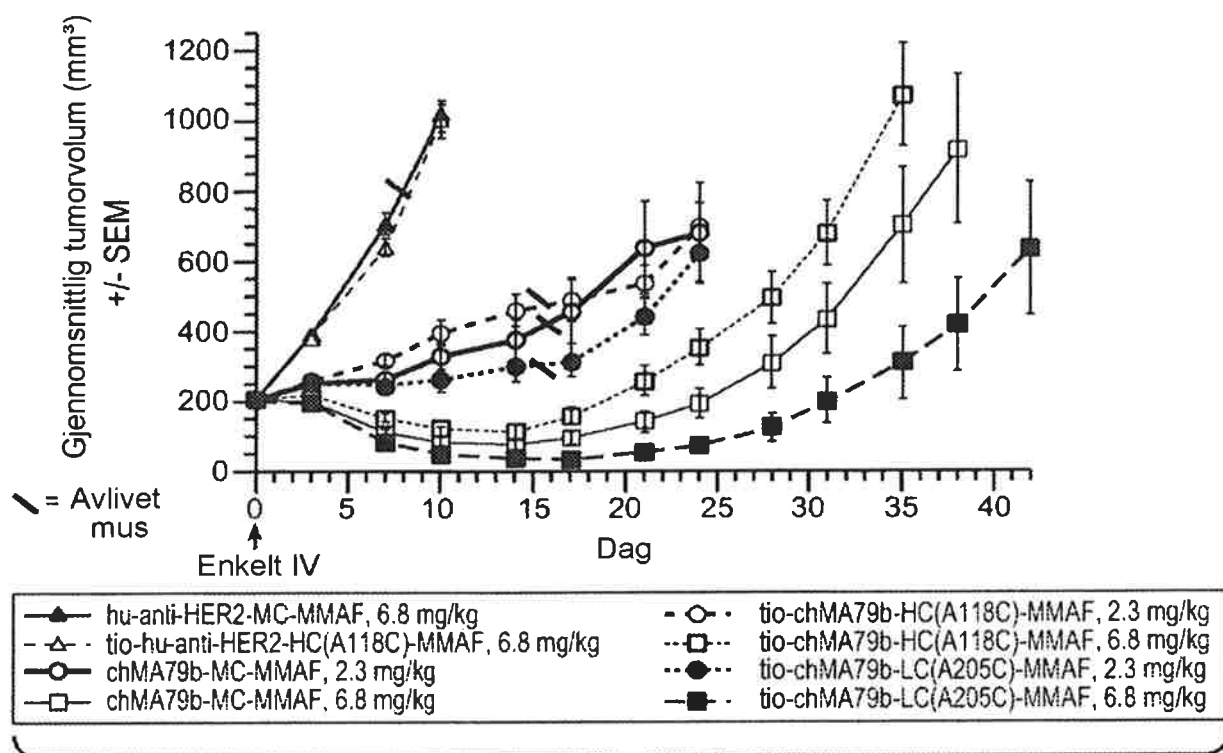


FIG. 33A

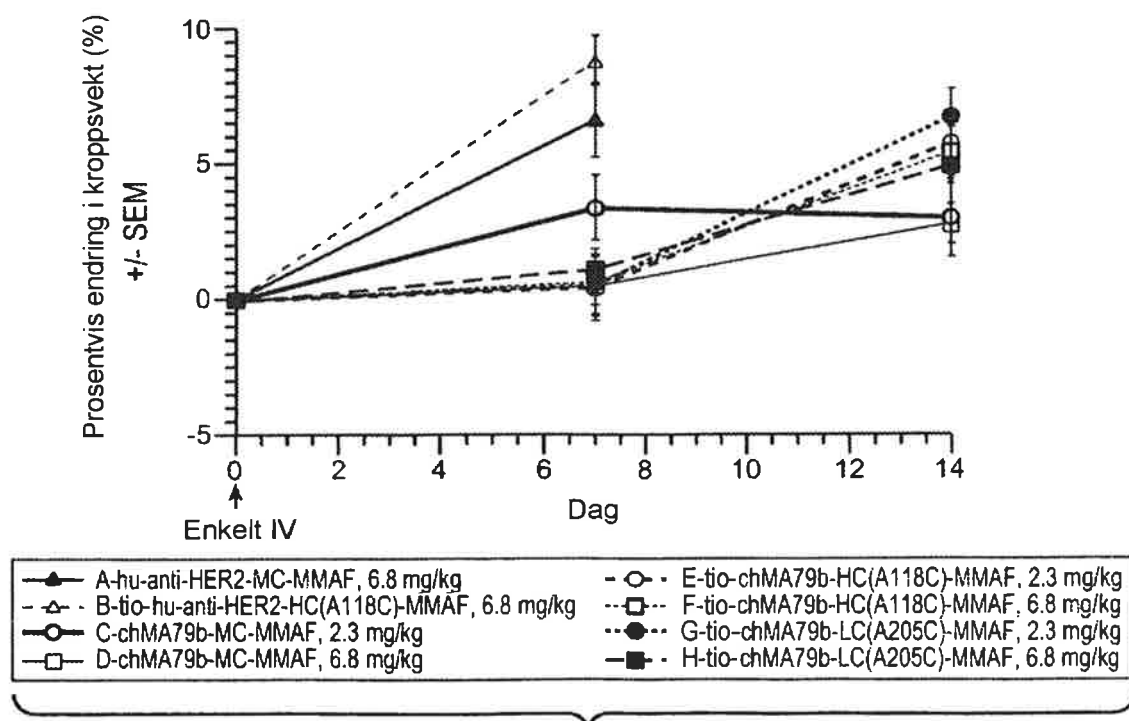


FIG. 33B

31

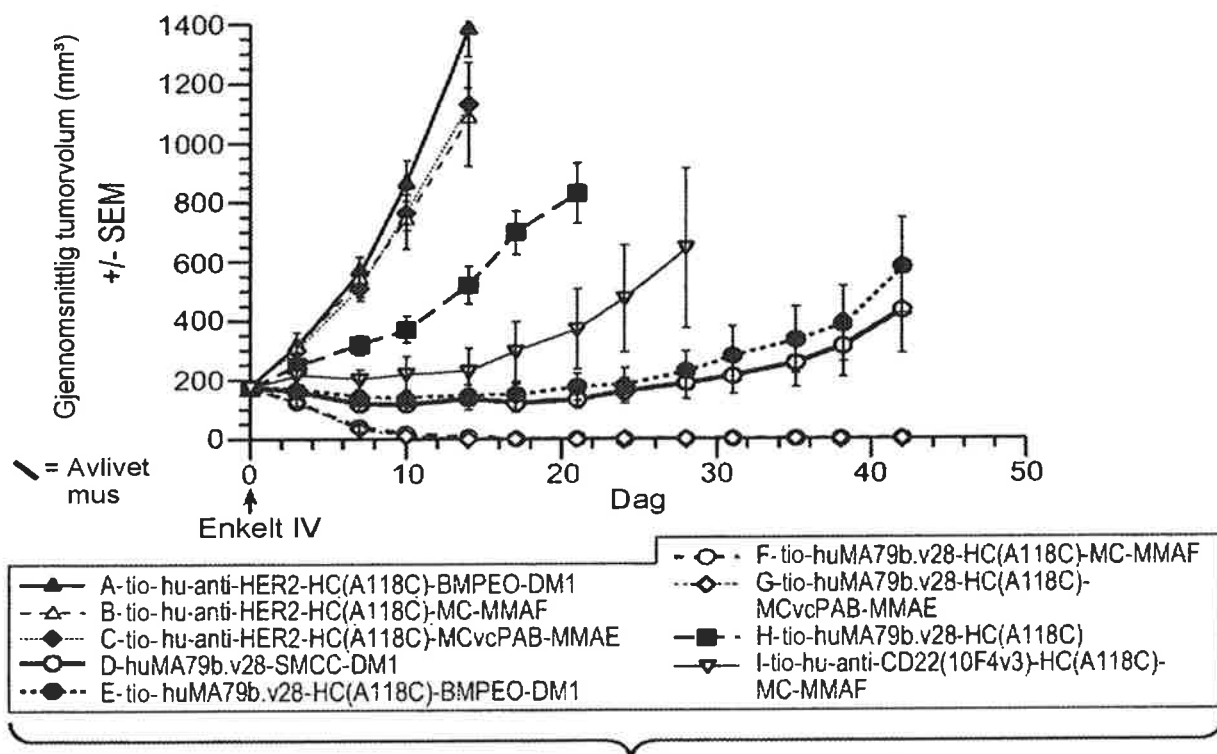


FIG. 34A

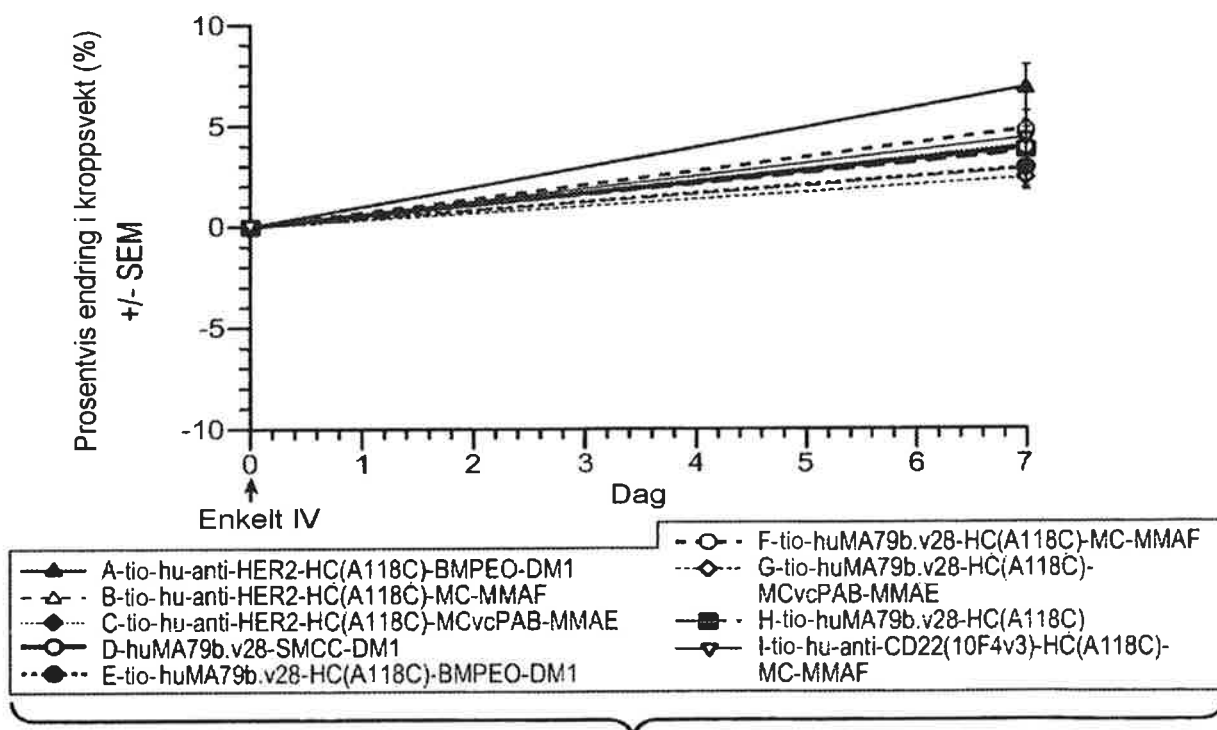


FIG. 34B

32

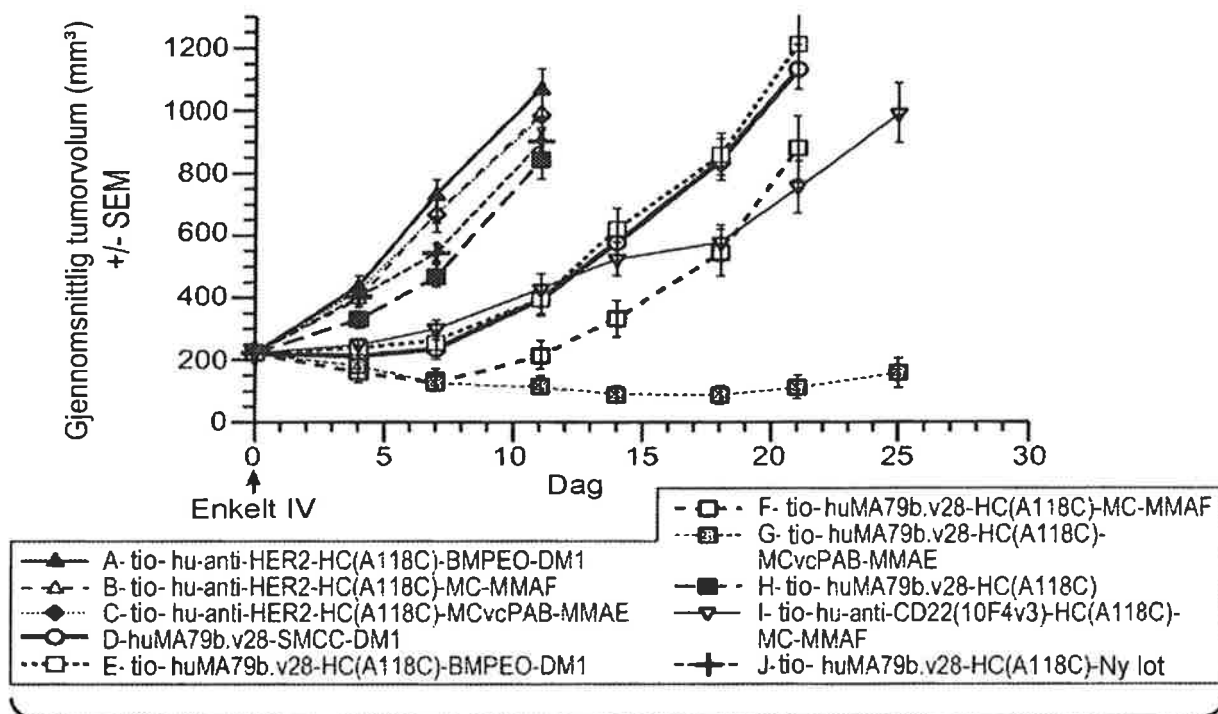


FIG. 35A

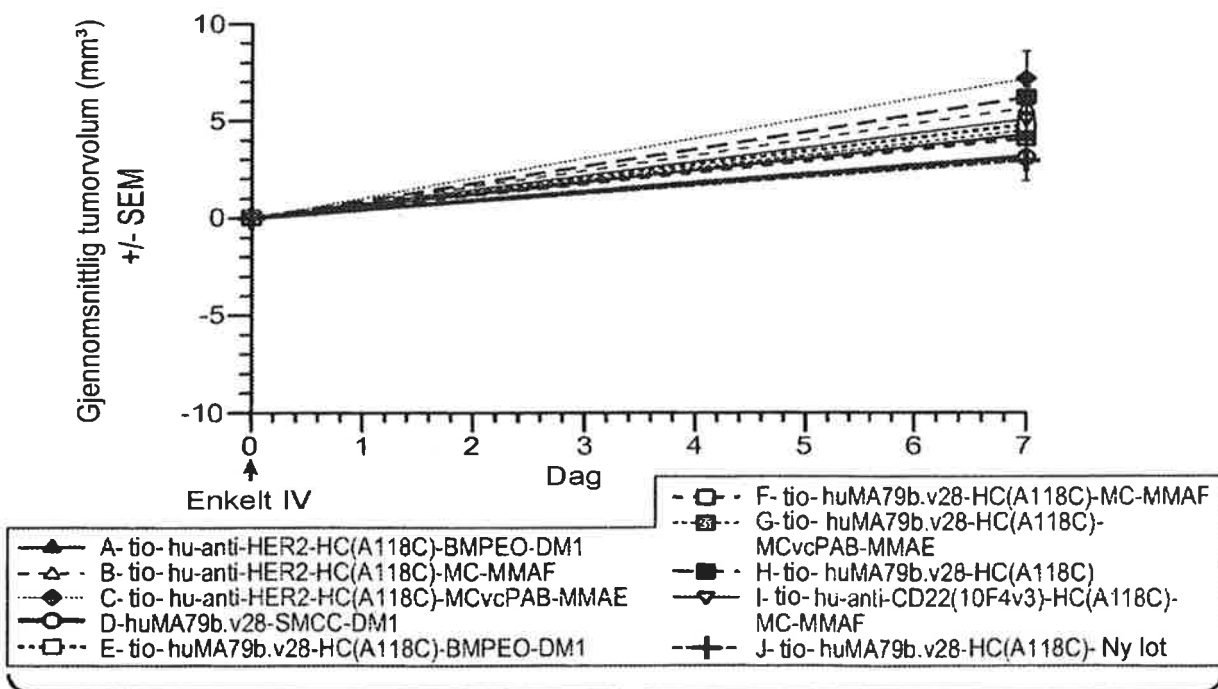


FIG. 35B

33

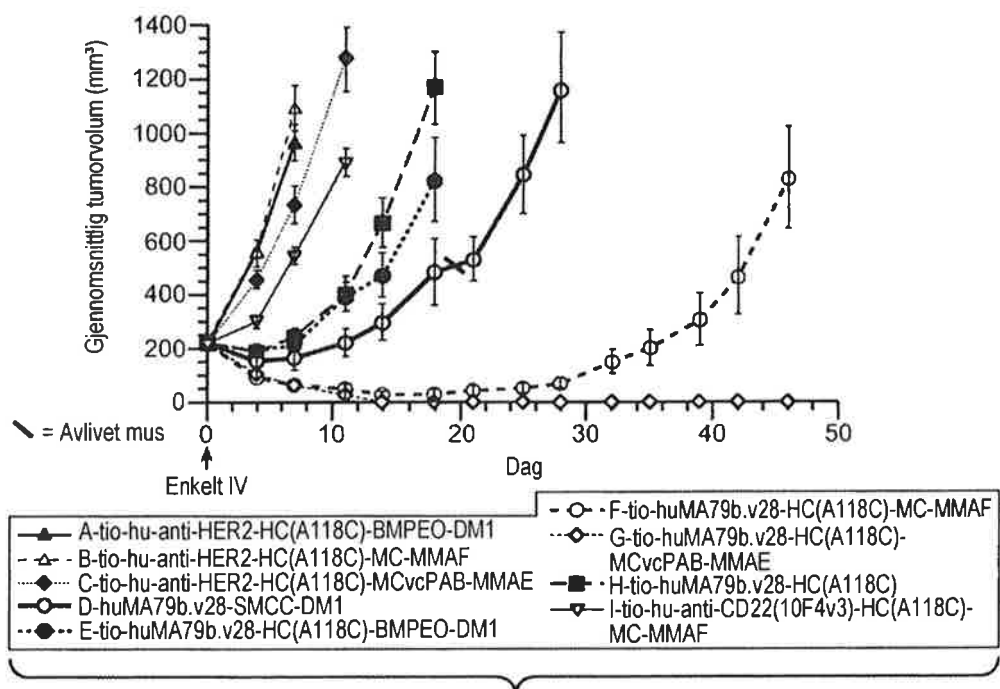


FIG. 36

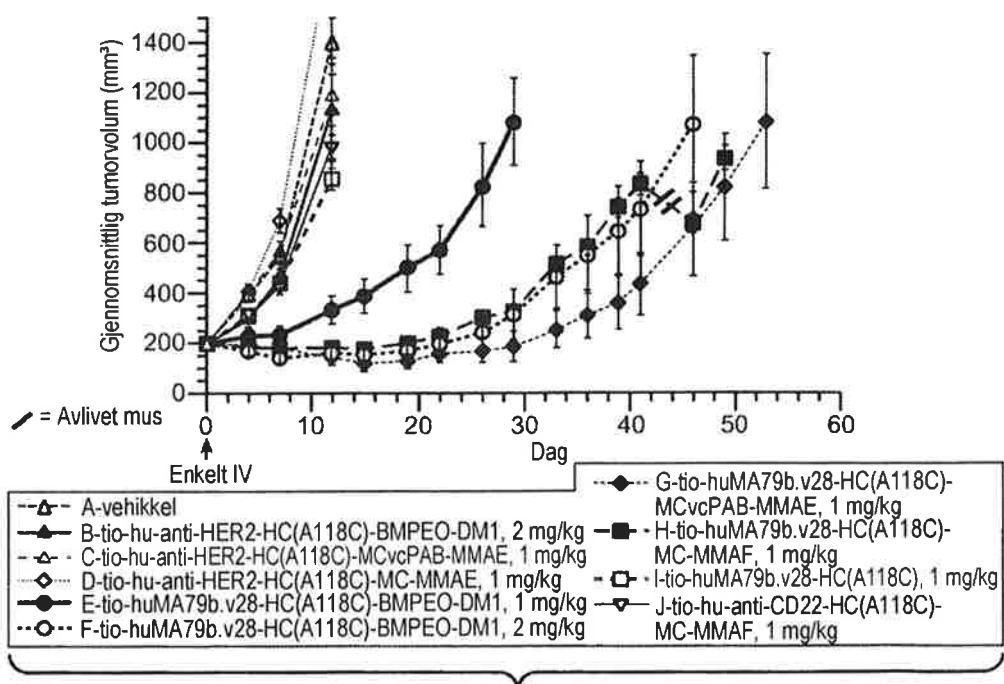


FIG. 37

34

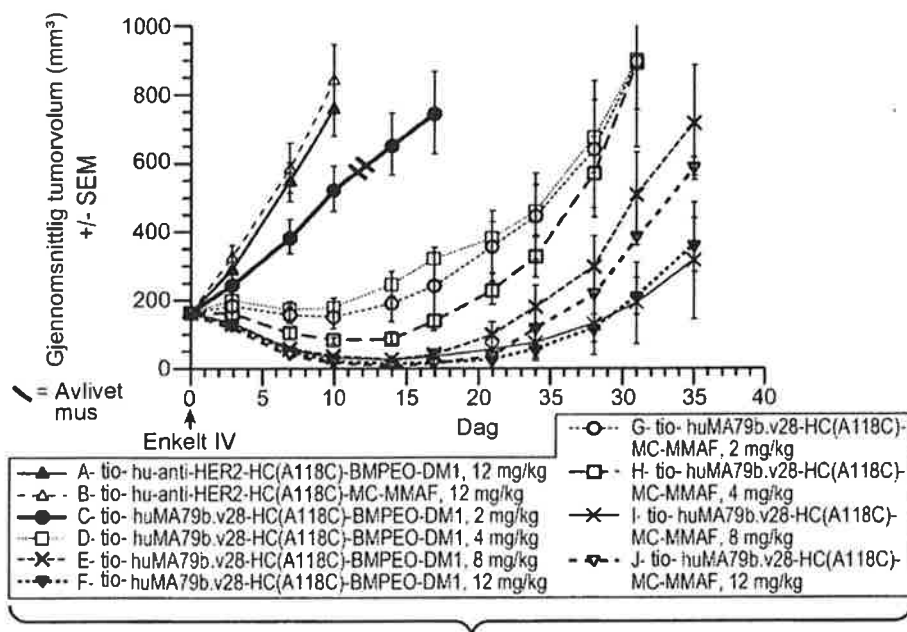


FIG. 38A

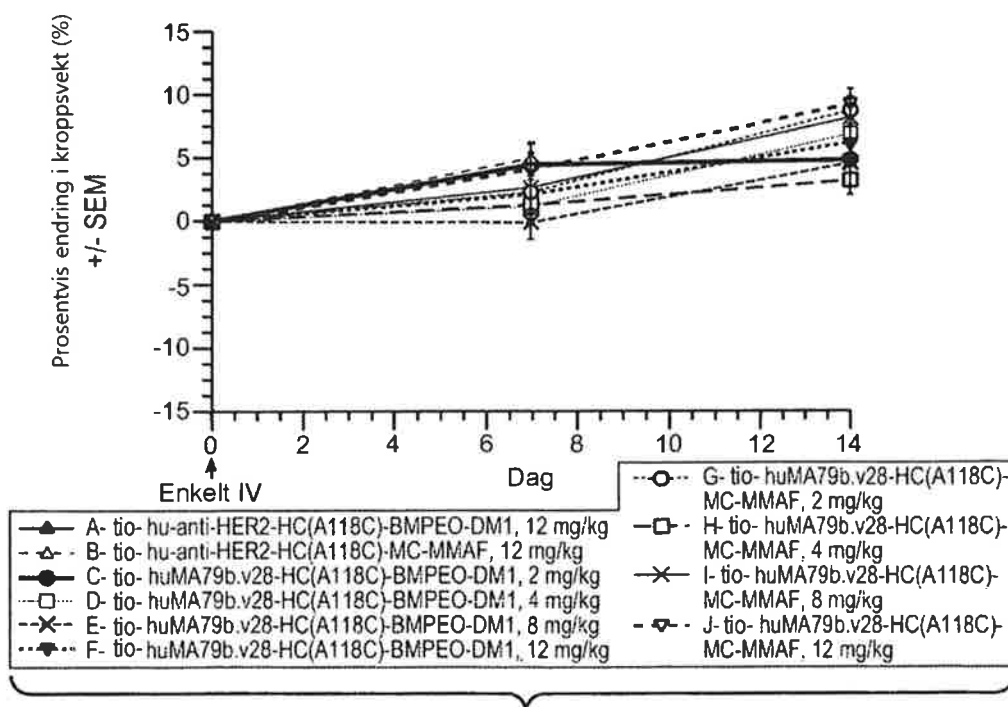


FIG. 38B

35

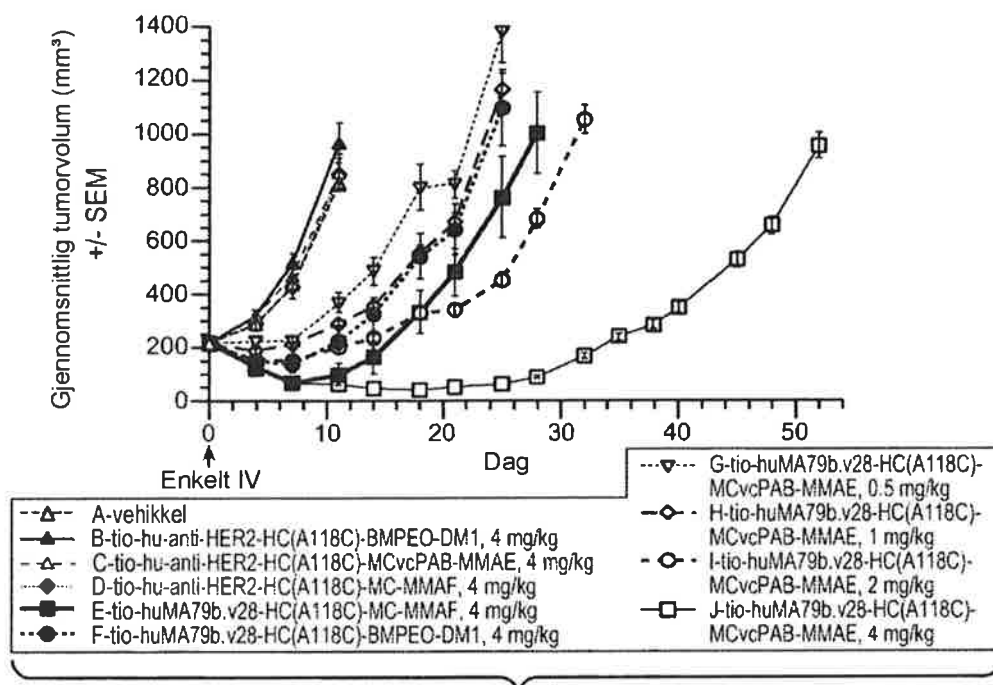


FIG. 39

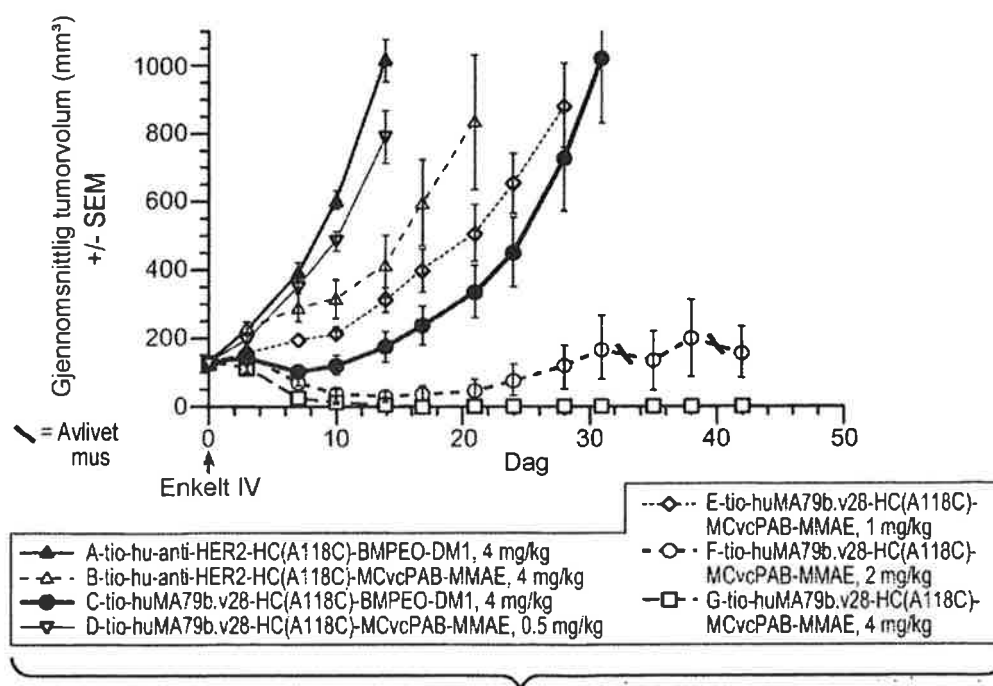
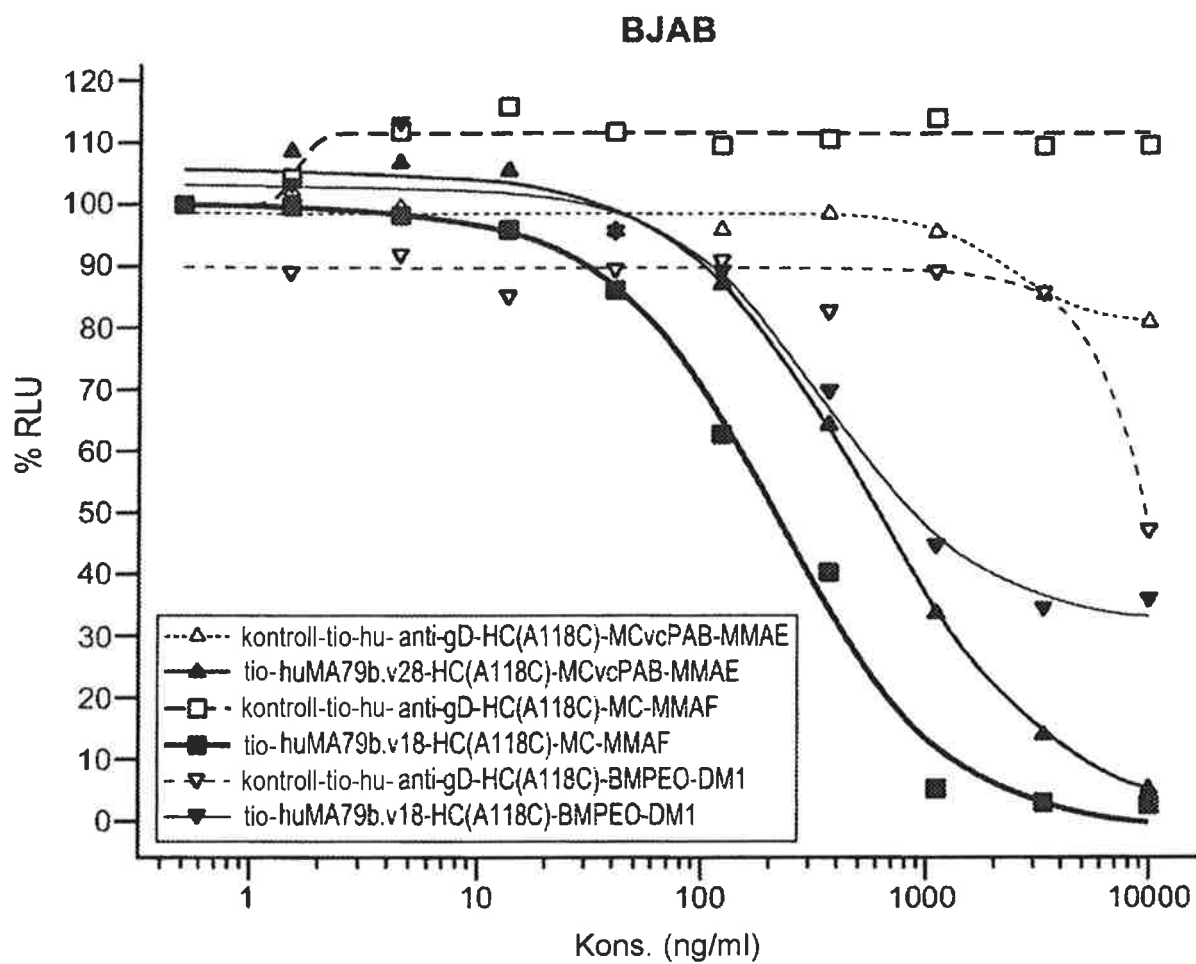


FIG. 40

36

*FIG. 41A*

37

Granta-519

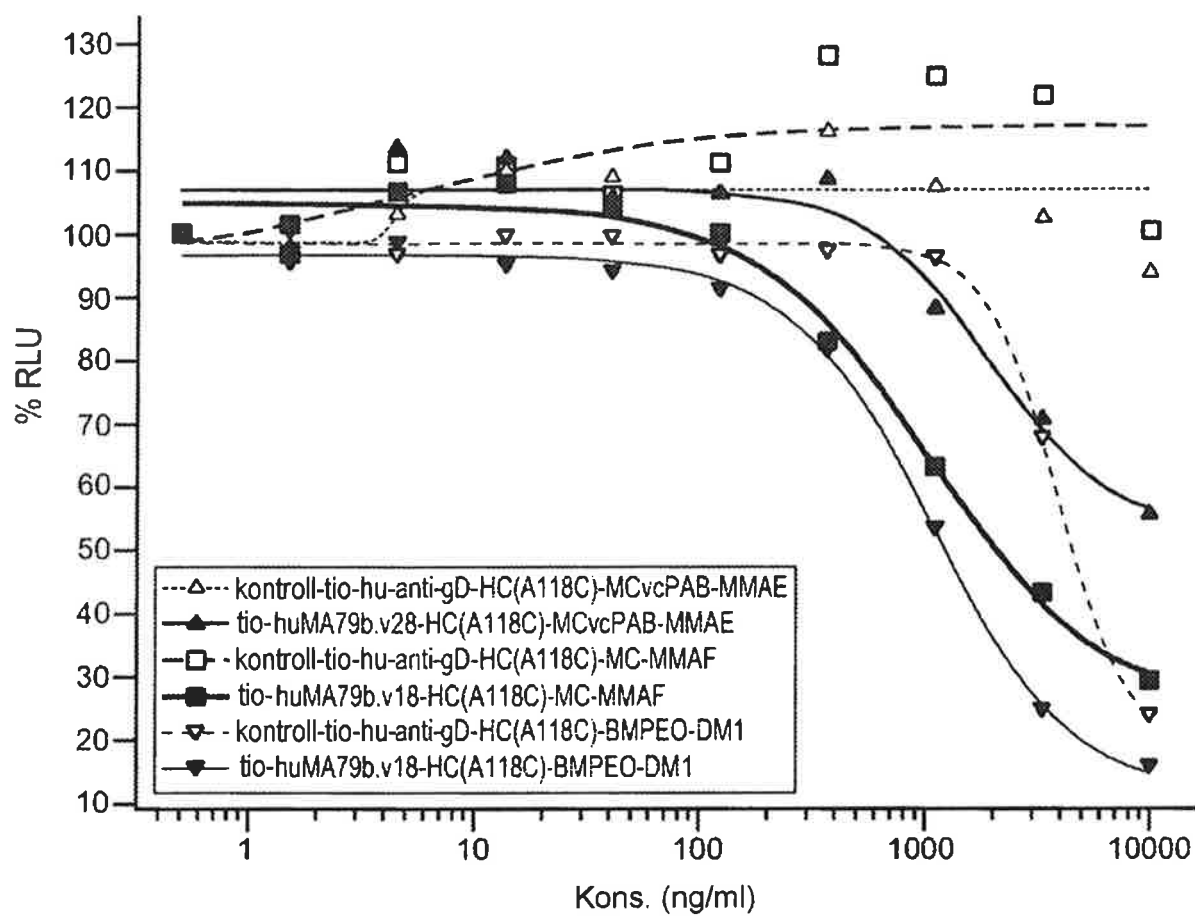


FIG. 41B

38

WSU-DLCL2

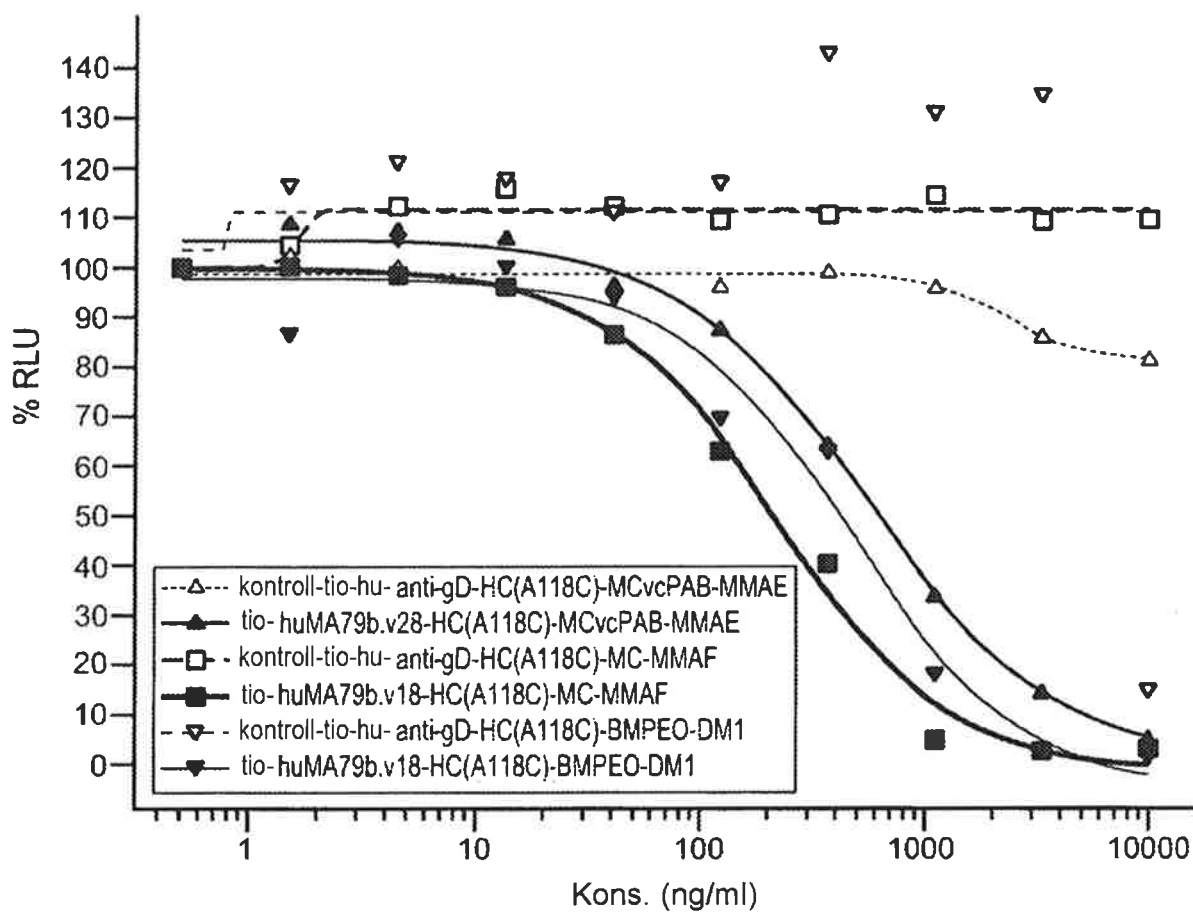


FIG. 41C

<p1.cynoCD79b

TCATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGG
CTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAT
TGCCCTTGGGGACAGAGCAGTGACCAATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGTGTCCAGCCACTGGC
TGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCAGCTGAGCCAGTGCCAGCAGCCAAATCAGAGGACCTG
TACCCGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTCTCGGATCTGGCAGAGCCCACGTTTCATAGCCAGGAA
ACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACGTGACCAACAGCACCTTCAGCATCGTGAGCTGGC
TCCGGAAGCGGGAGACGGACAAGGAGCCCCAACAGGTGAACCTGGAGCAGGGCCACATGCATCAG
ACCCAAAACAGCTCTGTCAACCACCTCATCATCCAAGACATCCGGTTTGAGGACAACGGCATCTA
CTTCTGTCAGCAGGAGTGCAAGACCTCGGAGGTCTACCGGGGCTGCGGCACGGAGCTGCGAG
TCATGGGGTTTCAACACCTTGGCACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGCATCATCATG
ATCCAGACGCTGCTGATCATCTCTTCATCATCGTGCCCATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGA
CAGCAAGGCCGGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACGGCCACCT
ACGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTGGGTGAGCACCCAGGTCAG
GAGTGAGAGCCAGGACCTCCCCACGGCCTGGGTGCAGGCTCCCCAGCC

FIG. 42

<p1.cynoCD79b
DNA548455

MARLALSPVSSHVLVALLLLLSAAEPVPAKSEDLYPNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
 VKMHCIYVTNSTFSIVSWLRKRETDKEPQQVNLEQGHMHQTQNSSVTTLIIQDIRFEDNGIY
 FCQQECSKTSEVYRGCGETLRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLL
 DKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Signalsekvens.

aminosyre 1-26.

Transmembrant domene.

aminosyre 161-181.

Immunoglobulindomene.

aminosyre 59-126.

Immunreseptortyrosinbasert aktiveringsmotiv.

aminosyre 195-215.

Domene i immunoglobulin V-sett.

aminosyre 44-145.

N-glykosyleringssted.

aminosyre 70-73, 103-106.

cAMP- og cGMP-avhengig proteinkinasefosforyleringssted.

aminosyre 81-84.

Proteinkinase C-fosforyleringssted.

aminosyre 50-52, 61-63, 84-86, 158-160, 214-216.

Kaseinkinase II-fosforyleringssted.

aminosyre 22-25, 84-87, 158-161, 208-211, 223-226.

Tyrosinkinasefosforyleringssted.

aminosyre 115-122.

N-myristoyleringssted.

aminosyre 41-46, 120-125.

FIG. 43

KIMÆR ANTI-CYNO-CD79b (ch10D10)-LETTKJEDE

ACCTCGGTTC TATCGATTGA ATTCCACCAT GGGATGGTCA TGTATCATCC TTTTCTAGT
 AGCAACTGCA ACTGGAGTAC ATTCAGATAT 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 CTCCAGGAG AGTGTCACAG AGCAGGACAG
 CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA
 ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG
 CTTCAACAGG GGAGAGTGTT AAGCTTGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA
 TAATGGTTAC AAATAAAGCA

*FIG. 44***KIMÆR ANTI-CYNO-CD79b (ch10D10)-LETTKJEDE**

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMWHQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
 FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNFPREKRVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

FIG. 45

KIMÆR ANTI-CYNO-CD79b (ch10D10)-TUNGKJEDE

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 CCCCCAACCG GTGACGGTGT
CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT
CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CTGTGCCCTC TAGCAGCTTG GGCACCCAGA
CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC
CCAAATCTTG TGACAAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG
GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC
CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT
GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA 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 ACGCCTCCCG
TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA
CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGAGTGCG ACGGCCCTAG AGTCGACCTG
CAGAAGCTTG GCCGCCATGG CCCAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA

FIG. 46**KIMÆR ANTI-CYNO-CD79b (ch10D10)-TUNGKJEDE**

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG. 47

Anti-cyno-CD79b ch10D10 A118C-cysteinkonstruert tungkjede-tioMAb**A. Sekvens i lett kjede****Tio-anti-cyno-CD79b (ch10D10)-HC-A118C (LC)**

DIVLTQSPFSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHHWQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
 FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQOSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 245)

B. Sekvens i tung kjede**Tio-anti-cyno-CD79b (ch10D10)-HC-A118C (HC)**

DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRIISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 244)

FIG. 48**Anti-cyno-CD79b ch10D10 V205C-cysteinkonstruert lettkjede-tioMAb****A. Sekvens i lett kjede****Tio-anti-cyno-CD79b (ch10D10)-HC-V205C (LC)**

DIVLTQSPFSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHHWQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
 FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQOSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHOGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 300)

B. Sekvens i tung kjede**Tio-anti-cyno-CD79b (ch10D10)-HC-V205C (HC)**

DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRIISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 299)

FIG. 49

44

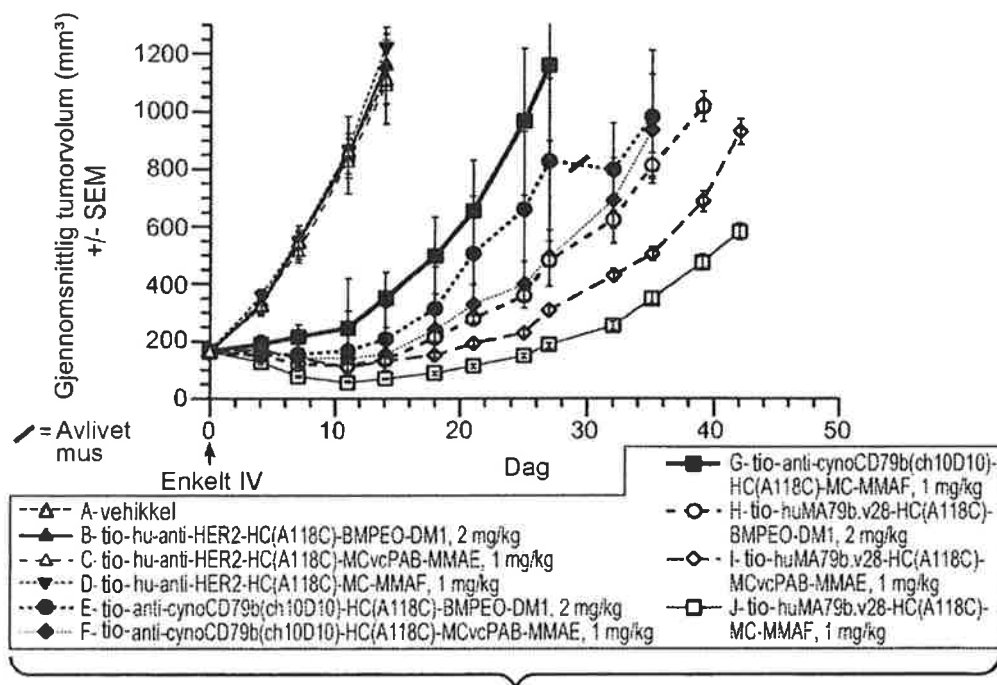


FIG. 50

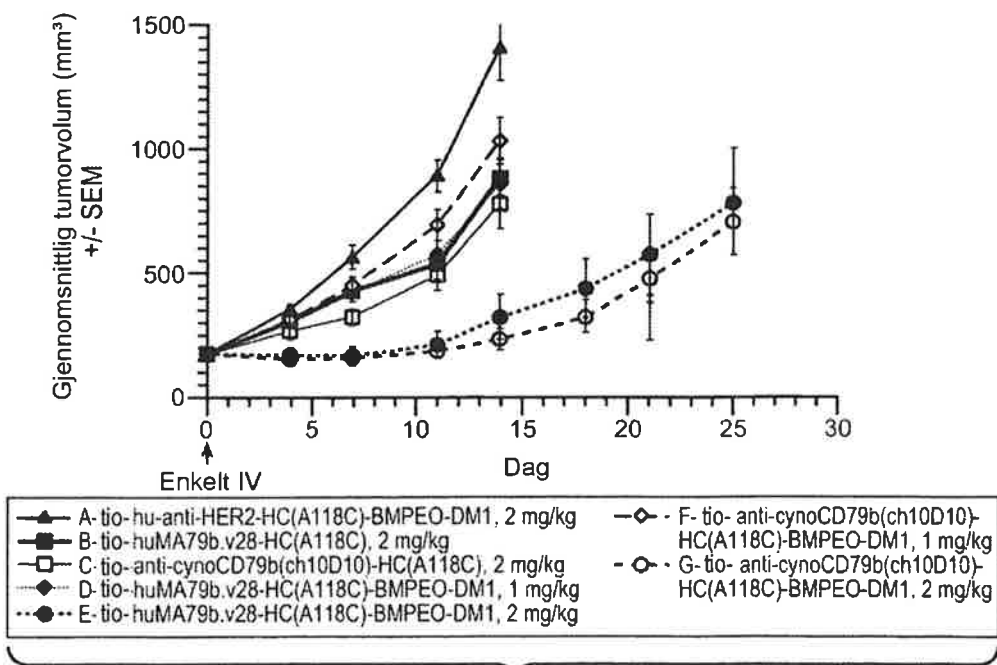


FIG. 51